

MAYRA MARINHO PRESIBELLA

**O EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS NA
QUIMIOTAXIA LEUCOCITÁRIA *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Co-orientador:

Profª Drª Almeriane Maria Weffort Santos

**CURITIBA
2003**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
<http://subsede.ufpr.br/~pgfarma>

Resumo da Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado

Título: "O EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS NA QUIMIOTAXIA LEUCOCITÁRIA *IN VITRO*"

Candidata: MAYRA MARINHO PRESIBELLA

A Comissão Examinadora reunida nesta data nas dependências do Setor de Ciências da Saúde, sede Botânico, composta pelas docentes: Dra. Almeriane Maria Welfort Santos (Presidente), Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado (Universidade Estadual de Maringá) e o Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Universidade Federal do Paraná), indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, após exame e julgamento da dissertação, atribui as seguintes notas:

Prof^a. Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado

Nota: 10,0

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Nota: 10,0

Prof^a. Dra. Almeriane Maria Welfort Santos

Nota: 10,0

A Comissão Examinadora aprova a dissertação com nota 100, conceito "A" e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.

Curitiba, 28 de maio de 2003.

- Prof^a. Dra. Almeriane Maria Welfort Santos - Presidente

Prof^a. Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado - UEM

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes - UFPR

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná em 1998, tendo sido Farmacêutica responsável pela Farmácia Karilla LTDA neste ano. Em 1999, iniciou o Curso de Especialização em Hematologia Clínica da Universidade Estadual de Ponta Grossa e assumiu o posto de Tenente Farmacêutico R2, no cargo de bioquímica responsável pelo setor de Hematologia do Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas (LAPC) do Hospital Geral de Curitiba (HGeC), no qual permanece até então. Também em 1999, foi a Farmacêutica responsável pela manipulação de quimioterápicos do Instituto Halsted LTDA. No ano de 2001, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, onde desenvolveu uma pesquisa sobre a influência de extratos de algumas plantas medicinais na quimiotaxia leucocitária, cujos resultados estão contidos nesta dissertação.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cezar e Marilda.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela Sua presença.

Ao Prof. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela seriedade e dedicação ao ensino e à pesquisa.

À Prof^ª Almeriane Maria Weffort Santos, cujo entusiasmo e apoio foram essenciais neste trabalho.

A todos os professores da UFPR, em especial aos professores Márcio Chimelli Duarte, Sandra Barrera, ao Antonio Carlos Boaretti, a Gisele Bordignon, Tânia Bonfim, a Iara Machado, a Wanda Abrahão, ao Roberto Pontarolo e a Maria Luiza, por suas especiais colaborações que tornaram possível a realização desse trabalho.

Às funcionárias Irene e Geni, pela contribuição na organização do laboratório para as experimentações.

À farmacêutica Klezia, pela indispensável cooperação na obtenção dos espectros de CG-EM.

À farmacêutica Elvira, pela estimulação no desenvolvimento deste trabalho.

À farmacêutica do HC da UFPR, Maria Matilde Z. Baracat, pela doação dos fármacos opióides usados neste estudo.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Hematologia e Farmacognosia, Aline, Carla, Lígia, Daniel, Jane, Éverson, Wesley, Kelly, Lilian, Wanessa e Larissa, pelas alegrias e tristezas compartilhadas durante os dois últimos anos.

Ao Laboratório de Estatística da UFPR, especialmente ao Prof. Adilson dos Anjos e aos alunos Dantas e Wanderley pelo estudo estatístico constante nesta obra.

Ao meu amigo Rosael, pelo apoio na área de informática.

Aos oficiais do HGeC, Tenente Coronel Zimerfeld, Major Basso, Major Juvenal, Tenente Célia e Tenente Samuel, pelo apoio inestimável à realização desse trabalho.

Aos meus pais Cezar e Marilda Presibella, pelo incansável apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos Kenia e Júnior, pelo incentivo durante a elaboração deste trabalho.

Ao meu namorado Gilson, pelo amor e compreensão.

EPÍGRAFE

“Se você acredita que pode, você tem razão. Se você acredita que não pode, você também tem razão.” Henry Ford
“Jamais desista daquilo que você realmente quer. A pessoa que tem grandes sonhos é mais forte do que aquela que possui todos os fatos.” (autor desconhecido)

SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
Inflamação e resposta inflamatória.....	2
Os neutrófilos e a quimiotaxia.....	4
Agentes indutores de quimiotaxia.....	13
A caseína como agente opióide e quimioatraente.....	15
Influência dos opióides na quimiotaxia leucocitária.....	17
Drogas antiinflamatórias.....	18
Busca de novos compostos com atividade antiinflamatória.....	20
OBJETIVOS.....	25
Objetivo geral.....	25
Objetivos específicos.....	25
MATERIAL e MÉTODOS.....	26
1. SOLUÇÕES.....	26
1.1. Meios líquidos.....	26
1.1.1. Solução salina tamponada com fosfatos.....	26
1.1.2. PBS suplementado.....	27
1.1.3. Solução hemolisante de Gey.....	27
1.1.4. Solução de caseína 5%.....	27
1.2. Meios semi-sólidos.....	27

2. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	28
3. ENRIQUECIMENTO E ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	28
3.1. Sedimentação espontânea à T.A.....	28
3.2. Centrifugação.....	29
3.3. Macromoléculas.....	29
4. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES.....	29
5. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS.....	29
6. POLARIZAÇÃO LEUCOCITÁRIA.....	30
7. MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA <i>IN VITRO</i>.....	30
8. CERTIFICAÇÃO DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA.....	31
9. INIBIÇÃO DA QUIMIOTAXIA LEUCOCITÁRIA INDUZIDA POR CASEÍNA.....	32
10. EXTRATOS DE PLANTAS.....	32
10.1. Material botânico e preparação dos extratos.....	32
10.2. Abordagem fitoquímica.....	33
10.2.1. Pesquisa de flavonóides.....	33
10.2.2. Pesquisa de alcalóides.....	34
10.2.3. Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos.....	34
10.2.4. Pesquisa de taninos.....	35
10.2.5. Pesquisa de saponinas.....	35
10.2.6. Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos.....	35
10.3. Obtenção do óleo essencial.....	36
10.4. Análise cromatográfica.....	36
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	37
Obtenção e isolamento de leucócitos humanos.....	38
Polarização leucocitária.....	39
Migração leucocitária.....	41
Certificação de migração.....	48
Inibidores da quimiotaxia leucocitária induzida pela caseína.....	52
EXTRATO DE PLANTAS.....	55

Abordagem fitoquímica.....	55
Influência dos extratos de plantas na quimiotaxia leucocitária.....	57
Comparação da eficiência do efeito inibitório da dexametasona e dos extratos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos.....	63
Contribuição ao estudo do mecanismo de ação do extrato hidroalcólico de camomila sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos.....	73
CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS.....	93-7

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.. Eventos leucocitários na inflamação.....	3
Figura 2.. Ciclo de motilidade celular sob microscopia de luz.....	7
Figura 3.. Ativação do neutrófilos.....	9
Figura 4. Câmara de Boyden.....	11
Figura 5. Ilustração esquemática do processo de migração através de filtros..	12
Figura 6.. Morfologia e viabilidade celulares.....	39
Figura 7. Polarização leucocitária induzida por caseína.....	41
Figura 8. Migração de PMN induzida por caseína.....	43
Figura 9.. Caseína induz preferencialmente a migração de granulócitos.....	46
Figura 10. Tempo de migração de PMN induzida por caseína.....	47
Figura 11. Migração leucocitária inibida por caseína.....	53
Figura 12. Efeito do extrato hidroalcoólico de camomila sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida por caseína.....	58
Figura 13. Efeito do extrato hidroalcoólico de pau-pra-tudo sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida por caseína.....	59
Figura 14. Efeito do extrato hidroalcoólico de cipó-suma sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida por caseína.....	59
Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico de canela-de-veado sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida por caseína.....	60
Figura 16. Comparação da eficiência da dexametasona e dos extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais sobre a inibição da quimiotaxia de leucócitos humanos.....	65
Figura 17. Cromatogramas CG-Em do óleo essencial de capítulos florais de camomila obtidos por hidrodestilação em Aparelho de Clevenger.....	68
Figura 18. Espectro de massa de artemísia cetona (II).....	69

Figura 19. Efeito do extrato hidroalcólico de camomila e de drogas opióides sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos.....	73
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores quimiotáticos indutores de polarização em leucócitos humanos.....	14
Tabela 2. Teste de certificação de migração para neutrófilos em diferentes concentrações e gradientes de caseína.....	32
Tabela 3. Características laboratoriais das amostras sangüíneas das populações utilizadas no estudo de migração leucocitária.....	38
Tabela 4. Efeito de gradientes de concentração de caseína sobre a migração de leucócitos humanos.....	49
Tabela 5. Abordagem fitoquímica do extrato bruto de (1) <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauchert ou camomila; (2) <i>Rauvolfia sellowiana</i> (Cham&Schul) ou pau-pra-tudo; (3) <i>Hybanthus bigibbosus</i> (St.-Hil.) Hassler ou canela-de-veado; (4) <i>Anchieta pyrifolia</i> (Mart.) G. Don. ou cipó-suma.....	56
Tabela 6. Comparação do efeito sobre a quimiotaxia leucocitária induzida por caseína entre os extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais, quando comparados com células não-tratadas.....	66
Tabela 7. Constituintes dos óleos essenciais de amostras de camomila nacional e importada obtidos por hidrodestilação e analisados por CG-EM, comparados com a literatura.....	70

ABREVIações E Fórmulas Químicas

AcOH	ácido acético
AlCl ₃	cloreto de alumínio
AINES	antiinflamatórios não esteroidais
Atm	atmosfera
ATP	adenosina trifosfato
BSA	soro albumina bovina
Ca ⁺²	íon cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
C3a	fração C3 do complemento, ativada
C5a	fração C5 do complemento, ativada
CC	beta quimiocina
CCR	receptor de beta quimiocinas
CMC	carboximetilcelulose
Conc.	concentrado
CHCl ₃	clorofórmio
COX	ciclooxigenase
Cu(AcO) ₂	acetato de cobre II
CXC	alfa quimiocina
CXCR	receptor de alfa quimiocinas
CXCR1	receptor 1 de alfa quimiocinas
DEXA	dexametasona
DNE	desvio nuclear à esquerda
EDTA-K ₃	etilenodiaminotetracetato tripotássico
EtOH	etanol
FeCl ₃	cloreto férrico
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
g	gramas
<i>g</i>	aceleração da gravidade
G-proteína	complexo protéico guanosina trifosfato
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i> , fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
He	hélio
H ₂ O	água
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HC	Hospital de Clínicas
HCl	ácido clorídrico
HGeC	Hospital Geral de Curitiba
HEC	hidroxietilcelulose
IL	interleucina
K ⁺	íon potássio
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de potássio
LTB ₄	leucotrieno B ₄

Linfócito NK	linfócito <i>natural killer</i>
M	mol; molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de magnésio heptahidratado
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
mmol/l	milimolar por litro
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	fosfato monossódico di-hidratado
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
nm	nanômetros
ORL	<i>opioid receptor-like</i> ; semelhante a receptor opióide
PAF	<i>platelet activating factor</i> , fator ativador de plaquetas
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , salina tamponada com fosfatos
PBSs	PBS suplementado
Pb(AcO) ₂	acetato de chumbo
PMN	polimorfonuclear, neutrófilo, granulócito neutrófilo
p/v	peso por volume
pH	potencial hidrogênioônico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
SNC	sistema nervoso central
T	tempo
T.A.	temperatura ambiente
TNF- α	<i>tumour necrosis factor alpha</i> , fator de necrose tumoral alfa
UI	unidades internacionais
v/v	volume por volume
ZAS	<i>zimosan activated serum</i> , soro ativado por zimosan

RESUMO

Vários métodos *in vitro* têm sido empregados para a investigação das atividades biológicas de plantas usadas na medicina popular para o tratamento de processos inflamatórios. Os eventos associados à resposta inflamatória são complexos, sendo a quimiotaxia uma das etapas fundamentais desse processo, recrutando leucócitos para o local da lesão.

Neste trabalho, investigou-se a influência dos extratos hidroalcoólicos de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, *Rauvolfia sellowii* Muell. Arg, *Hybanthus bigibbosus* (St.-Hil) Hassler e *Anchieta pyrifolia* (Mart.) G. Don, conhecidas popularmente como camomila, pau-pra-tudo, canela-de-veado e cipó-suma, respectivamente, sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos, estimulados a migrar contra um gradiente de caseína, utilizando-se o método de Boyden. Dexametasona foi utilizada como controle de inibição do procedimento experimental.

Os resultados aqui apresentados demonstraram efeito inibitório significativo sobre a migração de polimorfonucleares induzida por caseína para todas as plantas testadas. Entretanto, essa atividade variou de intensidade conforme a concentração e a espécie estudada. Para a camomila, onde analisou-se uma amostra produzida em solo local e uma importada, observou-se um efeito inibitório máximo de cerca de 34%, para ambas, nas doses de 10 e 0,1mg/ml, respectivamente, comparável aos 31% exercido pela dexametasona (10^{-5} M). Para os extratos de pau-pra-tudo, canela-de-veado e cipó-suma, esses valores foram de aproximadamente 20, 15 e 8%, nas doses de 1000, 10 e 1µg/ml, respectivamente.

De particular interesse, além do surpreendente efeito inibitório do extrato de camomila sobre a quimiotaxia dos leucócitos, foram os resultados observados quando essa atividade pôde ser parcialmente bloqueada pelo pré-tratamento dos leucócitos com as drogas morfina e naloxona, sugerindo a mediação desses efeitos via receptores opióides. Análise da composição do óleo essencial de ambas, com o objetivo de comparar qualitativa e quantitativamente seus componentes ativos, demonstrou inversão na constituição relativa dos óxidos derivados do α -bisabolol.

Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados aqui apresentados e as informações deles derivadas podem servir como uma base preliminar de dados, contribuindo para esclarecer a atividade antiinflamatória atribuída a essas plantas na medicina caseira.

Palavras chave: plantas medicinais, migração leucocitária, receptores opióides, caseína, inflamação, quimiotaxia.

ABSTRACT

Several *in vitro* methods have been used for the investigation of the biological activities of herbal plants used in folk medicine for the treatment of inflammatory conditions. The events associated with the inflammatory response are complex, and chemotaxis is just one of the fundamental steps of such process, which recruits leukocytes to the inflammatory sites.

In this study, we have investigated the ability of hydroethanolic extracts from *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, *Rauvolfia sellowii* Muell. Arg, *Hybanthus bigibbosus* (St.-Hil) Hassler and *Anchieta pyrifolia* (Mart.) G. Don, locally known as camomila, pau-pra-tudo, canela-de-veado, and cipó-suma, respectively, in interfering with the human leukocytes migration induced by casein, using the Boyden chamber method. Dexamethasone has been used as a positive control for leukocyte inhibition in the same experimental approach.

The data herein presented showed a significant inhibition of the casein-induced polymorphonuclear leukocytes migration for all plants studied. However, the intensity of such activity was variable according to the dose and plant tested. For camomila, the maximum inhibition effect was ~34%, similar to the 31% found for dexamethasone. For pau-pra-tudo, canela-de-veado, and cipó-suma extracts the values found were 20, 15, and 8%, for the doses of 1000, 10, and 1 µg/ml, respectively.

Of particular interest, apart from the unexpected leukocyte inhibitory effects of camomila extract, were the results observed after treating these cells with the drugs morphine and naloxone, in which such activity could be partially blocked, suggesting that these effects might be opioid receptors' mediated.

Analysis of the essential oil of both national and imported samples, with the aim of comparing the presence of active components, has shown an inversion of the relative constitution of the α -bisabolol derivative oxides.

Although further studies are needed, the results and suggestions presented in this study may be useful to clarify the anti-inflammatory properties of these herbal medicines, supporting their ethno-medical application in the treatment of inflammation diseases.

Key words: herbal plants, chemotaxis, leukocyte migration, opioid receptors, casein, inflammation, chemotaxis.

INTRODUÇÃO

O aprimoramento da saúde e o conhecimento técnico que vise melhorar a qualidade de vida estão se tornando cada vez mais complexos e onerosos. Muitos países vêm considerando as dificuldades para o consumo social de produtos farmacêuticos de alto custo e, até aqueles mais ricos, já perceberam a disparidade entre os altos preços dos serviços e a escassez dos benefícios gerados por tais sistemas (Eldin & Dunford 2001).

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversos tipos de doenças é tradicional na cultura humana e os serviços de saúde e as instituições a eles ligados devem estar voltados para o aproveitamento desse conhecimento tradicional (Eldin & Dunford 2001). Esta preocupação parece estar presente em nosso país, pois como fruto de deliberações ocorridas durante a 10ª Conferência Nacional de Saúde, realizada em Brasília em 1996, ressaltou-se "... a incorporação no SUS, em todo o país, de práticas de saúde como a fitoterapia, a homeopatia e a acupuntura" (parágrafo 286.12) (Saúde 1996a), deliberando-se também sobre "... terapias alternativas e práticas populares (parágrafo 351.10), além do incentivo à fitoterapia e à homeopatia na assistência farmacêutica pública" (Saúde 1996b).

A fitoterapia ressurge, então, como uma opção medicamentosa bem aceita e acessível a todos. Hoje, cerca de 80% da população dos países de terceiro mundo faz uso de produtos naturais para o tratamento de problemas primários de saúde (Mans *et al* 2000). Mesmo em países industrializados, uma grande porcentagem dos produtos farmacêuticos comercializados provém de produtos naturais (Eldin & Dunford 2001). Assim, os produtos extraídos de plantas medicinais continuam a representar uma diversidade química única, a qual continuará a ser uma fonte importante de compostos-modelo para programas de investigação clínica, iniciados a partir da observação das espécies de plantas regionais popularmente utilizadas.

De acordo com estudos de Willianson e colaboradores, estima-se que o planeta Terra possua entre 370.000 e 500.000 vegetais superiores que elaboram metabólitos secundários com potencial interesse medicinal (Willianson *et al* 1996). No Brasil, diante de uma flora tão rica e diversificada, a utilização de plantas como medicamentos caseiros é ampla, tornando imperativo para o país a criação de uma política de incentivo à investigação científica das potencialidades terapêuticas desta fonte alternativa de medicamento.

Vários modelos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, estão hoje disponíveis para tal investigação. De particular interesse são aqueles direcionados ao estudo das atividades antiinflamatórias devido ao grande número de espécies vegetais utilizadas na medicina popular para o combate de processos inflamatórios.

Inflamação e resposta inflamatória

A inflamação é fundamentalmente uma resposta de defesa e proteção do organismo afetado, cujos objetivos principais são a eliminação do agente agressor e das conseqüências que ele possa vir a causar.

A reação inflamatória é um fenômeno estereotipado, cujos sinais rubor, tumor, calor e dor foram primeiramente descritos por Celsius, 178 a.C. A estes, Galeno (Cotran 1994) adicionou a perda de função. Atualmente, sabe-se que estes sinais são conseqüências da liberação de substâncias químicas encontradas no local da lesão, particularmente, as citocinas (Silva 1978, Sedgwick & Willoughby 1985).

As citocinas inflamatórias são substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadores das respostas vascular e celular desencadeadas pelo estímulo inflamatório. Dentre elas, destacam-se as interleucinas 1 (IL-1), IL-6 e IL-8, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Springer 1994, Cassatella 1995, Springer 1995).

No decorrer de um processo infeccioso ou inflamatório, os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular devido à presença de mediadores da inflamação, liberados por células presentes na área de lesão, tais como bactérias, células lesadas ou frações do complemento, passando a ocupar uma posição mais periférica. Em seguida, aderem-se firmemente, mas de forma transitória, ao endotélio e atravessam a parede do vaso. Após a diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia (Dekker & Segal 2000).

Dessa forma, pelo menos três etapas estão distintamente envolvidas no desenvolver de um processo inflamatório: (1) adesão dos leucócitos ao endotélio, (2) sua passagem através do endotélio vascular e (3) migração em direção ao estímulo quimiotático (Dekker & Segal 2000, Mackai & Rosen 2000). A Figura 1 ilustra, de forma esquemática esses eventos.

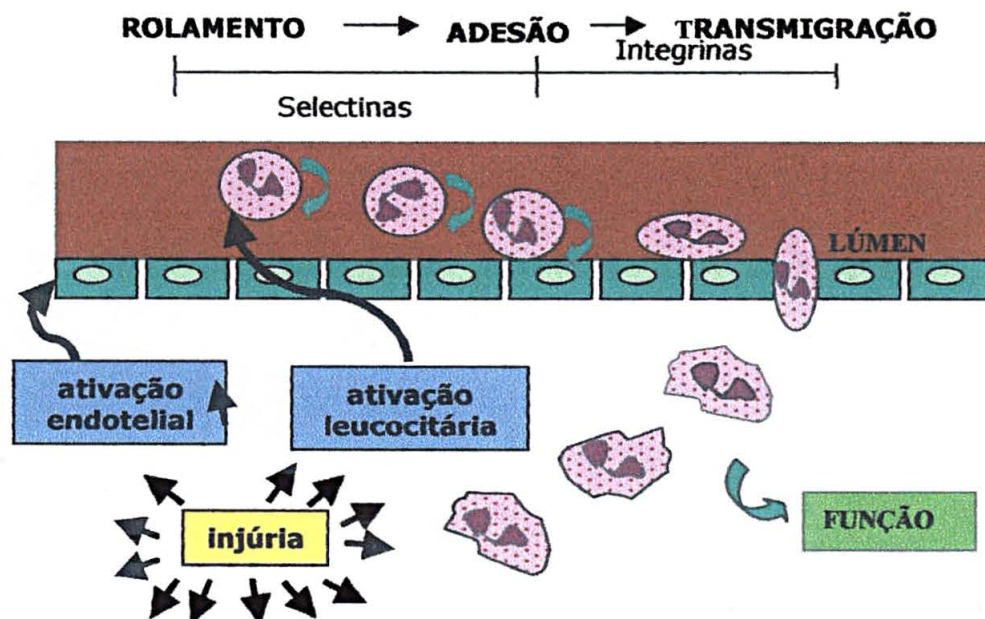


Figura 1. Eventos leucocitários na inflamação. Durante um processo inflamatório, os leucócitos, primeiramente rolam, fixam-se transitoriamente e aderem-se ao endotélio vascular, ocorrendo, então, a diapedese seguida da migração em direção aos estímulos quimiotáticos liberados no local da lesão.

Uma função crítica da inflamação é a migração de células especializadas provenientes do sangue periférico para o tecido conjuntivo no qual se situa o foco inflamatório. Estudos recentes têm demonstrado que os mecanismos moleculares que recrutam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (Mackai & Rosen 2000). Esses experimentos também mostram que a adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na matriz extracelular (Bokoch 1995, Dekker & Segal 2000).

A maioria dos receptores protéicos envolvidos na migração celular pertence à família de receptores associados ao complexo heterotrimérico da proteína G, genericamente denominados metabotrópicos (Rang *et al* 2001), os quais respondem através de uma sucessão de interações e desacoplamentos das subunidades protéicas α , β e γ até a associação final com uma enzima-alvo, a qual se torna uma ativadora de moléculas sinalizadoras, também denominadas mensageiros secundários (Alberts *et al* 1994).

A ativação de um receptor, seja qual for a sua família, ou o mecanismo de transdução por ele desencadeado, direciona o comportamento celular e culmina no desencadeamento de uma ou mais atividades celulares, incluindo os mecanismos observados nas respostas inflamatórias como a mobilização de Ca^{+2} intracelular (Hallet *et al* 1990), rearranjo do citoesqueleto (Smith *et al* 1979), exocitose, indução da expressão de receptores de superfície, mudanças na adesão e agregação (Smith *et al* 1979), indução da produção de superóxidos (Simchowitz & Spilberg 1979, Thelen *et al* 1993), aumento da atividade metabólica (Bokoch 1995), quimiotaxia (Zigmond 1977), dentre outras como revisado recentemente por Dudez e colaboradores (2002).

Os neutrófilos e a quimiotaxia

Das células com grande capacidade de responder a estímulos quimiotáticos destacam-se os granulócitos circulantes no sangue periférico. Dentre esses, os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleares (PMN),

constituem a população celular primária na defesa contra vários tipos de microorganismos presentes no meio ambiente, acumulando-se rapidamente no sítio invasivo ou de lesão. Sua participação no processo inflamatório é multifuncional e envolve (1) reconhecer seletivamente o agente agressor, responder apropriadamente por meio de (2) locomoção, (3) fagocitose do microorganismo e sua (4) eliminação. Para tanto, possuem a habilidade de secretar substâncias não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório (Lloyd & Oppenheim 1992, Cassatella 1995). Seu núcleo polilobulado permite ultrapassar poros muito menores que o seu diâmetro, característica esta que serve como pré-requisito à sua habilidade de se comprimir e passar através do pavimento de células endoteliais (diapedese) e continuar migrando em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia.

O neutrófilo é uma célula que participa da defesa inata e, nos tecidos, está presente em todas as portas de entrada do organismo humano que fazem contato com o meio externo. Com um tempo de vida média na circulação de aproximadamente sete horas (Quesenberry & Colvin 2000), passam a maior parte desse tempo trafegando no sangue periférico, num processo passivo. Para o mesmo número de neutrófilos que está circulando no leito central do vaso, tem-se igual quantidade na porção mais periférica, próxima ao endotélio, representando o subcompartimento marginal, denominado "*pool*" marginal.

Para que o organismo possa atender a uma demanda tecidual extra como, por exemplo, no combate a patógenos invasores, a medula óssea dispõe de um compartimento de reserva, composto por neutrófilos segmentados e seus precursores imediatos, os neutrófilos bastonetes e os metamielócitos. Assim, quando necessário, um maior número de leucócitos pode ser lançado na corrente circulatória, ocasionando leucocitose, geralmente acompanhada do aumento do número de neutrófilos segmentados (neutrofilia) e de bastonetes (desvio nuclear à esquerda, DNE). Essa leucocitose, em casos de uma infecção severa, pode ainda estar associada à alterações morfológicas características, como a presença de

granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacuolização citoplasmática, formando os chamados granulócitos tóxicos (Lee *et al* 1999).

Um dos eventos primários, portanto, na resposta inflamatória é o recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação, decorrente de diferentes estímulos relacionados à ativação dessas células. Sua presença disseminada pelo organismo, associada à habilidade de locomoção, permitem a essas células exercer estrita e contínua vigilância nos tecidos contra agentes estranhos (Springer 1995). Movendo-se a uma velocidade de até 30µm/min, são as células não-ciliadas mais rápidas do organismo humano (Ramsey 1972a, Ramsey 1972b). Seu movimento amebóide é um processo ativo que requer energia, cuja fonte provém do ATP gerado pela glicólise anaeróbica (Wilkinson 1974a).

De acordo com Sheetz e colaboradores (1999), este ciclo de motilidade, quando observado sob microscopia de luz comum, pode ser dividido em cinco fases:

- extensão da parte celular sensitiva ao estímulo (frente celular);
- adesão à matriz de contato (substrato);
- contração do citoplasma;
- liberação do sítio de contato;
- reciclagem dos receptores localizados na parte posterior da célula para sua parte anterior (frente).

A quimiotaxia, ou o movimento celular direcional a favor (quimiotaxia positiva) ou contra (quimiotaxia negativa) um gradiente químico, é comum à várias células eucarióticas e, no caso particular dos leucócitos, é o mecanismo pelo qual essas células se acumulam no sítio inflamatório (Wilkinson 1996).

Quando os PMN percebem um gradiente quimiotático, eles alteram sua forma, tornam-se morfológicamente orientados e migram continuamente (Zigmond 1978, Zigmond 1988), com a parte da célula que primeiro percebeu o gradiente (frente) tendendo a acumular actina polimerizada. A Figura 2 ilustra as diferentes morfologias adotadas quando um PMN é exposto à uma substância quimiotática. A resposta quimiotática é tão eficiente que uma célula pode perceber uma diferença de concentração menor do que 1% sobre sua superfície (Zigmond

1977). Porém, esta propriedade requer a presença de múltiplos receptores particularmente bem integrados, de forma que os PMN possam identificar diferenças de ocupação desses receptores por toda a extensão de sua superfície (Snyderman & Goetzl 1981).

Após estimulação quimiotática e ativação de vias alternativas de sinalização, ocorre a polimerização de actina monomérica solúvel, produzindo filamentos insolúveis ramificados (F-actina), que se concentram na bainha frontal (*lamellipodium*), em contraste com baixas concentrações no pólo oposto (*uropodium*) (Wilkinson 1996). Esta polimerização localizada empurra a membrana celular para frente, acompanhada de contração do pólo posterior, a qual é mediada pela miosina II (Chung *et al* 2001).

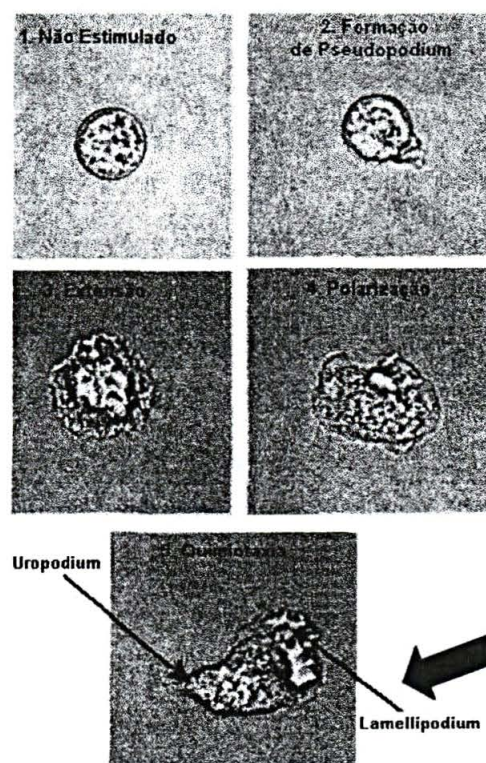


Figura 2. Ciclo de motilidade celular sob microscopia de luz. Quando um neutrófilo é exposto à uma substância estimulatória, ele responde alterando sua morfologia de esférica, não estimulada, para uma forma plana, iniciando com a formação do *pseudopodium*, extensão e polarização, quando a célula se torna, então, morfologicamente orientada em direção a maior concentração do estímulo (seta em negrito). Os quadros, como indicado, ilustram as fases sucessivas que levam à alteração morfológica final.

A polaridade morfológica é também funcional, pois a porção anterior da célula polarizada, que primeiro “percebeu” o gradiente de quimioatraente, possui mais receptores, sendo, portanto, mais responsiva que a porção posterior. Tal distribuição permite às células detectar, de forma mais acurada, a direção do estímulo, assim como distinguir pequenas diferenças de concentração de diversos fatores quimiotáticos durante o complexo processo de migração celular ao sítio inflamatório (Haston & Wilkinson 1987, Servant *et al* 1999, Dekker & Segal 2000, Servant *et al* 2000).

É importante salientar que a polarização e a redistribuição de receptores não requer a presença de gradientes quimiotáticos. Elas ocorrem igualmente quando as células encontram-se em concentrações uniformes de quimioatraentes, dependendo apenas da presença do quimioatraente. Este, numa concentração máxima, induzirá máxima polarização nas células (Haston & Wilkinson 1987). A Figura 3 ilustra, com pormenores, esses eventos.

Se os PMN são colocados sobre um substrato adequado, na ausência de qualquer substância estimulante, eles migram ao acaso, em várias direções e de forma persistente (movimento ao acaso ou randômico) (Devreotes & Zigmond 1988). Ao adicionar-se um agente estimulante, isto é, uma substância quimiotática ao meio, os PMN terão essa motilidade acelerada. Entretanto, caso não se possa precisar o local da fonte do estímulo (ausência de gradiente de concentração), esses movimentos acelerados também ocorrerão ao acaso. Este aumento de velocidade na motilidade é denominado quimiocinese (Keller, *et al* 1977).

A interação entre quimiotaxia e quimiocinese na resposta inflamatória é de extrema importância, pois a primeira leva os leucócitos ao local da lesão, enquanto a outra permite seu acúmulo. Ambas são necessárias ao exercício das multifunções celulares que concorrem para a morte (no caso de patógenos) e eliminação do agente invasor, assim como a reparação tecidual local (Wilkinson 1980).

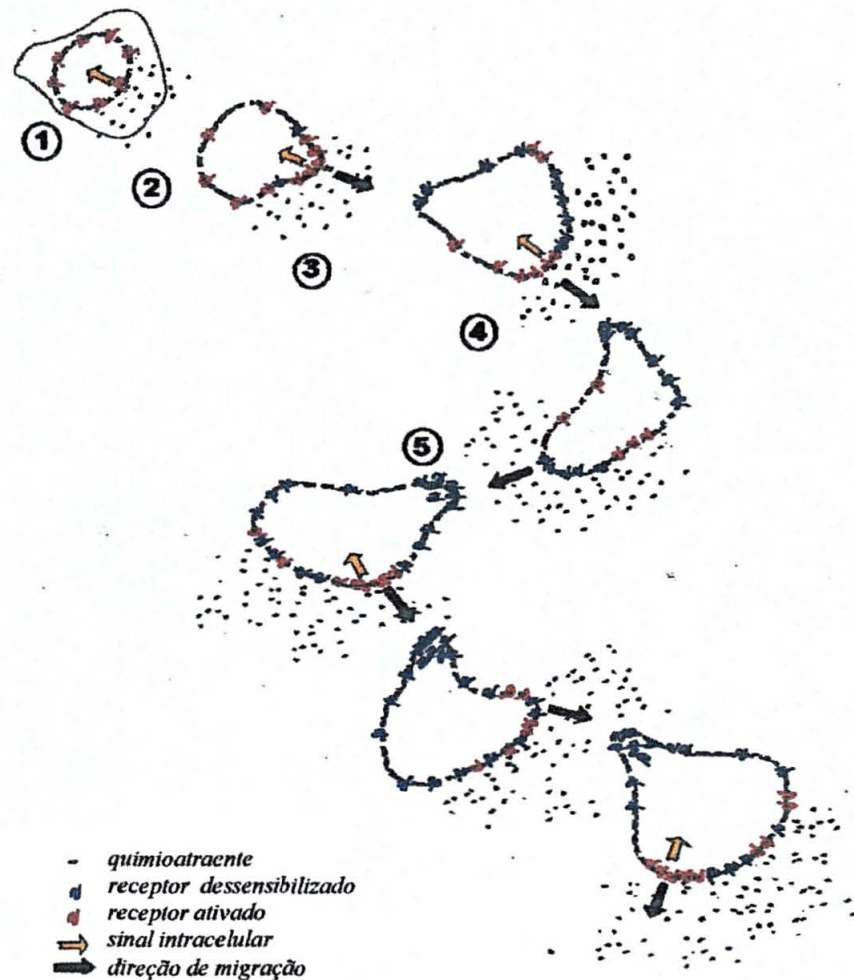


Figura 3. Ativação do neutrófilo. Uma célula percebe e responde a gradientes de concentração por meio de seus receptores. O local da superfície celular onde há maior densidade de receptores ocupados promoverá o sinal mais forte (seta amarela - passo 1). Aqui, o tamanho da célula está indicado pela linha pontilhada cinza, ainda em sua forma não ativada, arredondada. O estímulo quimiotático leva à polarização da célula (passo 2). A direção para a subsequente migração depende do recrutamento dos receptores localizados nas outras partes da membrana celular e na indução daqueles que estão ainda dentro dos depósitos de reserva intracitoplasmáticos (passo 3), expressando-se na região que primeiro percebeu o gradiente (em vermelho). A célula responde, então, especialmente ao estímulo, movendo-se ao acaso (passo 4), em zig-zag, na direção do estímulo. Após ligação do receptor com o ligante, os receptores tomam-se dessensibilizados (em azul), isto é, não respondem mais ao ligante, sendo reciclados (passo 5). Adaptado de Hanston 1987, Servant 1999, Servant 2000, Dekker 2000.

A observação de que mediadores químicos induziam migração direcional dos leucócitos levou Pfeffer, cujos estudos relacionavam-se à migração de células vegetais, a usar o termo quimiotaxia (Pfeffer 1884). Alguns anos mais tarde, neste mesmo contexto, o oftalmologista Leber propôs que fagócitos podiam “perceber” e, em seguida, mover-se em direção a gradientes de concentração de determinadas substâncias (Leber 1888), denominadas quimioatraentes. Assim, o fenômeno da quimiotaxia foi apropriadamente definido como a reação pela qual a direção de locomoção das células é determinada por uma fonte local de substância quimioatraente (Keller *et al* 1977). Metchnikoff sugeriu, então, que os leucócitos seriam “atraídos” para o sítio inflamatório e que os fagócitos constituiriam a defesa básica contra infecções graves na maioria dos animais, incluindo os seres humanos (Metchnikoff 1893). Esta teoria fagocítica lhe conferiu, em 1908, o prêmio Nobel (Wilkinson 1996, Wilkinson 1998).

A quimiotaxia leucocitária propriamente dita, ou seja, a migração estimulada de fagócitos, iniciou-se em meados do século XX, quando Comandon, utilizando cinematografia, demonstrou que bactérias e parasitas estimulavam a migração direcional de leucócitos (Comandon 1917). Os grupos liderados por McCutcheon e Dixon foram os primeiros a quantificar respostas quimiotáticas e chamarem a atenção para o fato de que certas substâncias químicas têm a habilidade de mudar a direção do movimento celular (McCutcheon & Dixon 1936, Dixon & McCutcheon 1938). Para De Bruyn, o movimento dos leucócitos assemelhava-se ao das amebas, fazendo o uso de pseudópodos através da transformação de seu conteúdo celular da forma de “gel” para “sol” (De Bruyn 1945). Este efeito está, provavelmente, relacionado à passagem da actina do seu estado solúvel, monomérica, ao filamentoso, polimerizado (Wilkinson 1996, Wilkinson 1998), como anteriormente citado.

Em 1962, Boyden introduziu o uso de uma câmara artificial (Figura 4), confeccionada em material rígido que, ao ser separada em dois compartimentos por filtros de porosidade inferior ao diâmetro celular (Figura 5), pode medir a atividade de migração (Boyden 1962). Este método tomou-se o modelo “*in vitro*”

mais utilizado para análise da quimiotaxia de leucócitos (Wilkinson 1996, Wilkinson 1998).

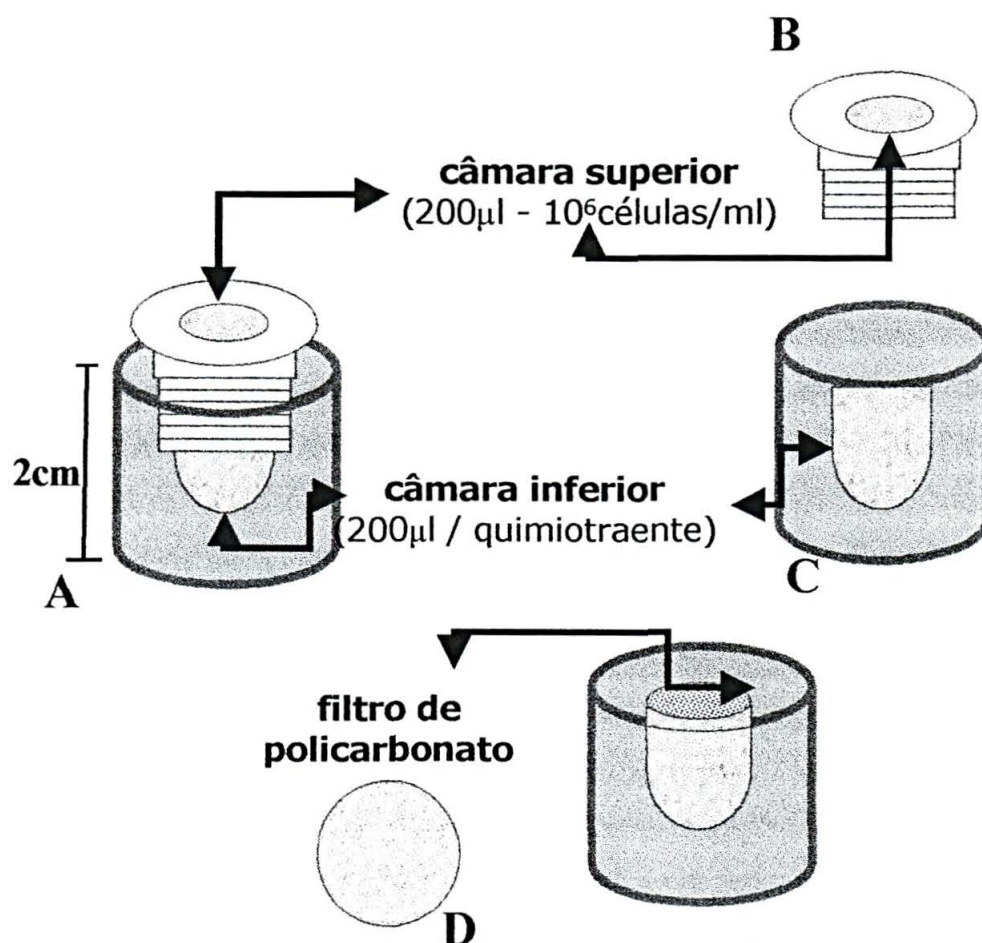


Figura 4. Câmara de Boyden. A câmara de Boyden esquematicamente representada (A) consiste em um cilindro de acrílico separado em um compartimento superior (B), o qual recebe a população celular a ser estudada, e um compartimento inferior (C), o qual é preenchido pela substância quimioatraente, formados quando um filtro de polycarbonato ou éster de celulose (D) é colocado entre eles.

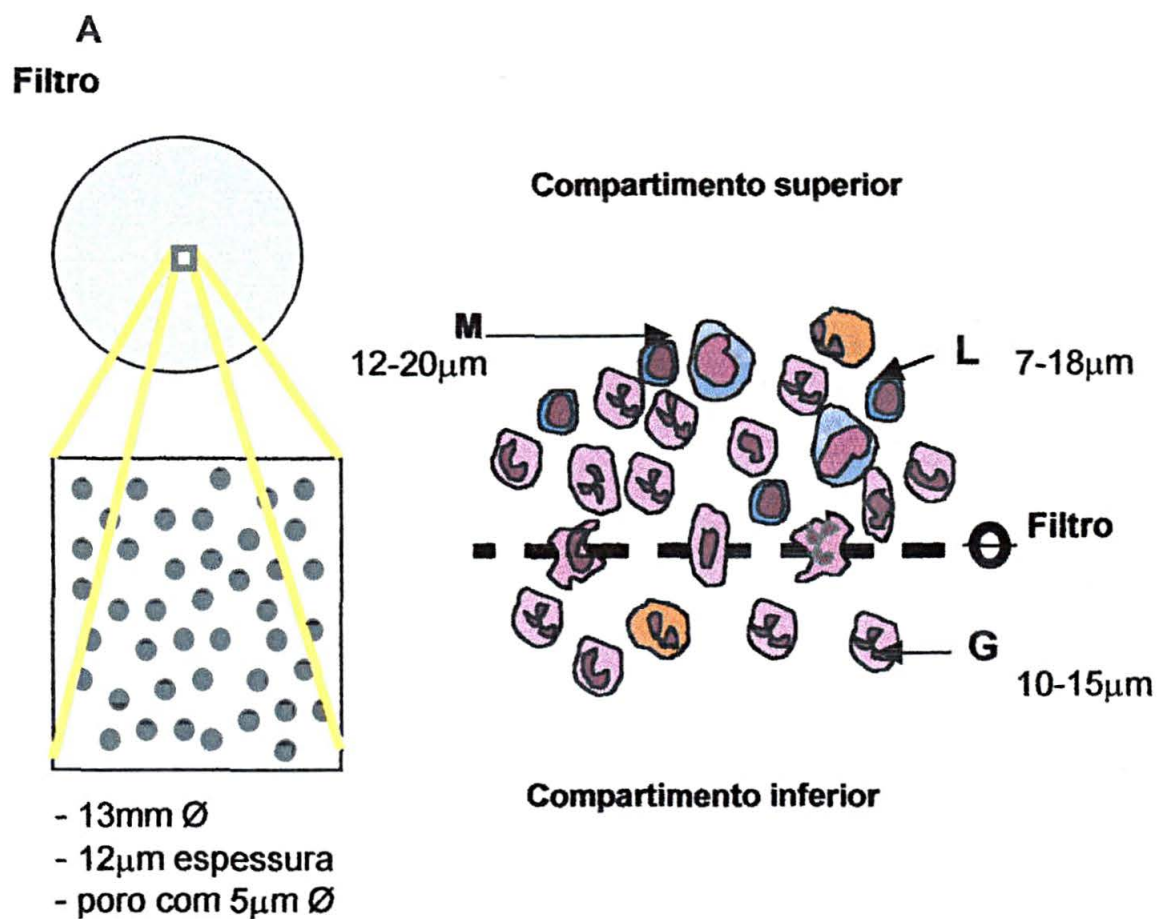


Figura 5. Ilustração esquemática do processo de migração através de filtros. Leucócitos estimulados por quimiotraentes migram, de forma ativa, através de um filtro separador (A) de porosidade inferior ao diâmetro celular, tornando possível a avaliação da atividade migratória.

Agentes indutores de quimiotaxia

As substâncias capazes de induzir quimiotaxia, denominadas quimioatraentes, não constituem uma classe específica de compostos e podem ter natureza exógena ou endógena. Dentre as substâncias exógenas que provocam alterações no comportamento locomotor dos leucócitos encontram-se alguns produtos de bactérias, como os peptídios *N*-formilados (fMLP) (Rabgaoui *et al* 1994, Qu *et al* 1995, Johansson *et al* 2002); certas citotaxinas como a caseína (Wilkinson 1974b, Wilkinson 1988a, Lewis & Van Epps 1983, Rabgaoui *et al* 1994, Siddiqui *et al* 1999, Wang *et al* 2001), os derivados de bactérias como os lipopolissacarídeos (Qu *et al* 1995), proteínas desnaturadas (Wilkinson 1988a), entre outras. Dentre as substâncias endógenas, as mais conhecidas são as citocinas, as quais, de modo geral, são capazes de estimular todos os tipos de leucócitos do sangue. Dessas, destacam-se algumas moléculas como a IL-8, o interferon gama, o TNF- α , além de componentes do sistema complemento como as frações C3a e C5a, os produtos relacionados à lipoxigenação do ácido araquidônico (leucotrienos), particularmente o LTB4 e o fator de ativação plaquetária (PAF) (Lewis & Van Epps 1983, Wilkinson 1988a, Cotran *et al* 1994, Bokoch 1995, Siddiqui *et al* 1999, Johansson *et al* 2002).

Recentemente, uma nova família de citocinas capazes de induzir quimiotaxia em vários tipos celulares foi descrita, recebendo a denominação genérica de quimiocinas. Caracterizam-se por serem moléculas pequenas, com 70 - 80 resíduos de aminoácidos, agrupadas em quatro famílias de acordo com o número de aminoácidos entre os dois primeiros resíduos de cisteína dos quatro presentes na molécula (Springer 1995), e que possuem certa especificidade por diferentes subtipos de leucócitos (Baggiolini 1998). As α -quimiocinas (CXC) tendem a induzir quimiotaxia em neutrófilos e em células envolvidas com reparo tecidual. Seu representante mais conhecido é a IL-8, que pode interagir com os receptores CXCR1 e CXCR2. Já as β -quimiocinas (CC) agem preferencialmente sobre monócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e linfócitos T (Baggiolini 1998).

Como ilustrado na Tabela 1, há um certo grau de especificidade da substância quimiotática em relação ao tipo de célula-alvo, assim como uma relação dose-dependente. Por exemplo, algumas substâncias que são muito potentes para ativar a quimiotaxia em neutrófilos, podem provocar moderada resposta em monócitos e serem inativos com linfócitos. Outras, estimulam vários tipos celulares, mas em concentrações diferentes. Além disso, uma substância pode, eventualmente, ligar-se a diferentes tipos de receptores, assim como um receptor pode acoplar-se a ligantes diferentes. Esta situação é referida na literatura como promiscuidade ligante-receptor (Broxmeyer & Kim 1999).

Tabela 1. Fatores quimiotáticos indutores de polarização em leucócitos humanos.

Máxima concentração efetiva (M) por tipo celular			
FATOR QUIMIOTÁTICO	Neutrófilos	Monócitos	Linfócitos
C5a	10^{-8}	10^{-8}	inativo
FMLP	10^{-9}	5×10^{-9}	inativo
LTB4	10^{-8} to 10^{-9}	10^{-9}	inativo
PAF	10^{-5} to 10^{-6}	10^{-7}	inativo
Soro Albumina Humana (desnaturada)	5×10^{-5}	5×10^{-5}	5×10^{-5}
TNF- α	10^{-9}	10^{-9}	inativo
Caseína	ativa	ativa	inativo

C5a (fração C5 do complemento, ativada), FMLP (*N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina), LTB4 (leucotrieno B4), PAF (fator ativador de plaquetas), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Adaptado de Lewis *et al* 1983; Wilkinson 1988 e Siddiqui *et al* 1999.

A complexidade das interações ligante-receptor, a redundância de receptores e as interações entre diferentes caminhos intracelulares sinalizadores dificultam, o entendimento dos diversos eventos celulares específicos desencadeados durante uma resposta inflamatória, incluindo aqueles que envolvem a quimiotaxia (Broxmeyer & Kim 1999).

A caseína como agente opióide e quimioatraente

Há muitas substâncias capazes de induzir quimiotaxia nos leucócitos, particularmente nos PMN, e esta lista continuará, sem dúvidas, aumentando. Muitos peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite, que são assim chamados por comportarem-se como substâncias exógenas regulatórias de muitas funções biológicas importantes, como as atividades antihipertensiva, imunomodulatória, antitrombótica e antibactericida (Meisel 1997), vêm sendo adicionados à ela.

De especial interesse há a caseína, a fração protéica mais abundante do leite, a qual, desde a primeira demonstração do seu efeito quimioatraente por McCutcheon (McCutcheon & Dixon 1936), vem sendo amplamente utilizada em estudos que investigam a quimiotaxia de várias células (Solymossy *et al* 1986).

Representando 80% e 40% das proteínas no leite de ruminantes e humanos, respectivamente (Kampa *et al* 1996), a caseína apresenta-se sob a forma de um complexo macromolecular de α , β e κ -caseínas, unidas em suspensão por cálcio na forma de micelas insolúveis (Lewis & Van Epps 1983). Seus fragmentos peptídicos, obtidos por digestão enzimática, exibem diversas propriedades biológicas semelhantes à de peptídeos endógenos, particularmente como mensageiros químicos (Teschemacher *et al* 1997). São encontrados, bem como seus receptores, em diversos tecidos e órgãos, indicando sua importância funcional na biologia dos mamíferos (Farrell *et al* 2002).

Das características funcionais mais conhecidas desses peptídeos, a que mais se destaca é a sua ação opióide (Brantl *et al* 1979, Brantl 1984, Teschemacher *et al* 1997, Godoy & Kitchen 2000), com diversos efeitos descritos na modulação das funções autônomas como respiração, pressão sanguínea, termoregulação e motilidade gastrointestinal (Massote *et al* 2002), além de serem elementos-chave no sistema nervoso central (SNC), especialmente com relação à percepção da dor (Akca *et al* 2002). Some-se a esses, os efeitos inibitórios descritos sobre as respostas imunes celular e mediada por anticorpos, na atividade das células NK, na expressão de citocinas e na atividade fagocítica (revisado em Skabo *et al* 2002).

Como descrito para outras moléculas, esses peptídeos exercem suas ações como agonistas puros, agonistas parciais ou antagonistas, através da interação com receptores específicos presentes nas células-alvo através das proteínas G. O acoplamento ligante-receptor, transfere para o citoplasma um ou mais sinais químicos, via ativação da adenilato ciclase, desencadeando respostas celulares específicas (Rang *et al* 2001). Independentemente, facilitam também a abertura de canais de K^+ e inibem a abertura de canais de Ca^{+2} , causando hiperpolarização e inibindo a ação de neurotransmissores, respectivamente (Rang *et al* 2001).

Há, pelo menos, quatro tipos de receptores opióides descritos: μ , δ , κ (Fowler & Fraser 1994) e ε (Nock *et al* 1993). Um quinto tipo foi recentemente relatado como pertencente à família ORL, mas, em contraste com os anteriores, parece exercer efeitos anti-opioides (Mollereau *et al* 1994). Esses receptores exibem diferentes funções farmacológicas, mas têm seus efeitos celulares mediados pela ativação do complexo proteína G (Gomes *et al* 2002, Massote *et al* 2002, Skabo *et al* 2002). Por exemplo, a ativação do subtipo μ_1 resulta em analgesia, enquanto μ_2 leva à depressão respiratória, sedação, dependência física, dentre outras. Porém, ativação de receptores κ resulta em analgesia e sedação (Manica 1997).

Como seus ligantes, os receptores opióides foram descritos em vários tecidos, mas são mais abundantes no SNC. São, também, encontrados em vários tecidos periféricos, incluindo as células do sistema imunitário (Stefano *et al* 1993, Chuang *et al* 1995, Grimm *et al* 1998a,) e, particularmente, nos leucócitos (Pasotti *et al* 1992, Makman *et al* 1995). Parece haver similaridades entre essas células e o tecido neuronal em relação à subunidade estrutural desses receptores e os mecanismos de transcrição de sinais (Mazzone *et al* 1994).

A presença de receptores opióides no SNC e no sistema imunitário sugere que peptídeos opióides podem agir em ambos. Neste contexto, importante é o relato recente de que granulócitos secretam peptídeos opióides, principalmente β -endorfinas ligante agonista endógeno μ (Manica 1997, Machelska *et al* 2002). Como sugerido por Cabot, esses peptídeos, ao serem

liberados no tecido inflamado, poderiam atuar, eventualmente, nos receptores opióides das terminações nervosas sensoriais periféricas, interferindo nos seus efeitos (Cabot 2001). Estas considerações têm relevância clínica fundamental, pois os opióides endógenos parecem estar envolvidos no controle de alguns sinais e sintomas clássicos da inflamação aguda como a dor e o calor, influenciando a analgesia (Machelska *et al* 2002) e a hipotermia (Baker & Meert 2002), respectivamente.

Influência dos opióides na quimiotaxia leucocitária

Há diferentes tipos de ligantes para receptores opióides que podem ser diferenciados de acordo com sua estrutura química. Além dos peptídeos já descritos, há os alcalóides, produtos naturais resultantes do metabolismo de certos tipos de plantas, e seus derivados sintéticos.

Como exemplo clássico de um agonista natural está a morfina, que atua preferencialmente em receptores μ (Stefano *et al* 1993), usada clinicamente como fármaco anestésico ou como bloqueador nas síndromes de dores intensas e cuja habilidade de modular a atividade de macrófagos (Roy *et al* 1991, Peterson *et al* 1993, Rojavin *et al* 1993), a produção de anticorpos (Bussiere *et al* 1993, Eisenstein *et al* 1995), a função de linfócitos NK (Freier & Fuchs 1994, Carr *et al* 1996), os níveis de citocinas (Bian *et al* 1995, Bertolucci *et al* 1996), a proliferação (Bryant *et al* 1988, Eisentein *et al* 1991), migração (Perez-Castrillon *et al* 1992, Makman *et al* 1995, Chao *et al* 1997, Grimm *et al* 1998a, Grimm *et al* 1998b) e a apoptose celular (Fuchs & Pruett 1993, Stinghal *et al* 1998, Chadzinska *et al* 1999) tem sido amplamente descrita. A naloxona, ao contrário, é um exemplo de composto antagonista, conhecido por reverter muitos dos efeitos da morfina (Rang *et al* 2001). Difere desta, também, por ligar-se a pelo menos três receptores opióides com diferente seletividade ($\mu > \kappa > \delta$) (Rang *et al* 2001, Baker & Meert 2002).

A interferência dos opióides em processos inflamatórios tem sido investigada em diferentes sistemas experimentais. Apesar das variações nas condições de estudo utilizadas e dos animais usados nesses modelos, os resultados mostram um achado comum: diminuição das funções celulares importantes para a resistência do hospedeiro, particularmente na resposta a estímulos quimiotáticos (Chadzinska *et al* 1999, Miyagi *et al* 2000).

O efeito dos opióides sobre os leucócitos de seres humanos é bem conhecido (Stefano *et al* 1993, Makman *et al* 1995, Miyagi *et al* 2000). Por exemplo, Mazzone e colaboradores, ao estudarem essas células provenientes de pacientes usuários de heroína e metadona, demonstraram correlação inversa entre um aumento da expressão de receptores opióides e a diminuição dos níveis de expressão de integrinas, da produção de radicais superóxidos e da resposta celular à estímulos quimiotáticos quando comparados a indivíduos saudáveis, sugerindo disfunção das células envolvidas nas respostas inflamatória e imune nesses indivíduos (Mazzone *et al* 1994, Mazzone *et al* 1996).

Exposição de leucócitos a opióides parece, portanto, promover respostas disfuncionais dessas células, podendo levar a um comprometimento do estado de saúde do hospedeiro.

Drogas antiinflamatórias

A reação inflamatória, quando exacerbada, pode ser potencialmente prejudicial, como aquelas observadas nas reações de hipersensibilidade à picadas de insetos, na ingestão de drogas, na presença de toxinas, nas doenças crônicas como artrite reumatóide, aterosclerose ou fibrose pulmonar (Cotran *et al* 1994). Nessas situações, necessário se faz o uso de drogas com atividade antiinflamatória, as quais irão interferir em um ou mais passos da cascata de eventos que caracterizam a resposta inflamatória, particularmente, naquelas que se relacionam com os mecanismos de adesão e migração dos leucócitos.

Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs).

Os corticóides, quando utilizados como antiinflamatórios com o objetivo de amenizar os sinais de uma inflamação aguda (Lomas *et al* 1991), parecem ter múltiplas atividades, influenciando na adesão de polimorfonucleares (MacGregor *et al* 1974, MacGregor 1976, McGillen & Phair 1979); promovendo a fagocitose e a morte intracelular dos microorganismos fagocitados (Chretien & Garagusi 1972); reduzindo a migração das células inflamatórias do sangue para os tecidos (Ward 1966, MacGregor *et al* 1974, McGillen & Phair 1979, Yamaguchi *et al* 1994), além de diminuir a citotoxicidade celular mediada por anticorpos (Roth & Kaeberle 1981).

Embora os mecanismos de ação ainda não tenham sido totalmente elucidados, sabe-se que os glicocorticóides interagem com receptores intracelulares pertencentes à família de receptores que controlam a transcrição gênica. Estudos sugerem que entre 10 - 100 genes respondem aos esteróides em cada célula. Após penetrarem nas mesmas, os corticóides ligar-se-iam a receptores específicos no citoplasma que, por sua vez, tomar-se-iam ativados, sofrendo alterações na sua conformação, expondo um domínio de ligação ao DNA, resultando na formação de um complexo esteróide-receptor. Como resultado, haveria um efeito repressor ou indutor sobre alguns genes particulares, alterando uma ou mais respostas celulares (Rang *et al* 2001). É dentro desse contexto que os corticóides têm papel clínico relevante, sendo amplamente utilizados em situações onde a modulação das respostas imune e inflamatória são necessárias.

Há vários estudos demonstrando que os corticóides, em particular a dexametasona, são capazes de inibir, *in vitro*, a quimiotaxia de diferentes populações de leucócitos, em especial a dos polimorfonucleares (Lomas *et al* 1991, Yamaguchi *et al* 1994, Zentay *et al* 1999). Esta habilidade tem sido usada na sua seleção como droga padrão em ensaios experimentais onde deseja-se modular negativamente a migração leucocitária.

Já a classe dos antiinflamatórios representada pelos AINEs como a aspirina, o paracetamol ou o ibuprofeno, parece intervir na atividade da ciclooxigenase (COX), enzima que media a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores lipídicos envolvidos em diferentes funções fisiológicas normais, assim como nas respostas inflamatória e imune (Wagner & Roth 2000). Estes têm, ainda, ampla ação sobre a vasodilatação, o edema e a dor (Martinez *et al* 1999, Rang *et al* 2001).

Alguns AINEs foram descritos atuando, *in vitro*, na inibição da adesão e do processo de migração nos leucócitos, assim como na redução da expressão de várias moléculas de adesão e das interações leucócito-endotélio (Martinez *et al* 1999).

Busca de novos compostos com atividade antiinflamatória

As características mais comuns a todos os antiinflamatórios disponíveis no mercado, e em particular para os glicocorticóides, são seus efeitos colaterais indesejáveis e o alto custo.

A variabilidade de climas e regiões no Brasil favorece o desenvolvimento de uma incomparável biodiversidade vegetal. Dentro dela, há um grande número de plantas usadas na medicina popular com finalidade terapêutica específica. Por exemplo, fármacos como a camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), que cresce abundantemente em nosso solo, têm sido usados no tratamento de diversas doenças caracterizadas por estados inflamatórios. Seus capítulos florais têm sido amplamente produzidos na região metropolitana de Curitiba, mas sem os cuidados de cultivo ou de comercialização apropriados, julgados por parâmetros de controle de qualidade recomendados para a espécie. Por exemplo, amostras comercializadas têm se apresentado adulteradas, contendo quantidade de matéria orgânica estranha muito acima dos 5% permitidos (Farmacopéia 1996), comprometendo o teor de óleo volátil presente nas flores.

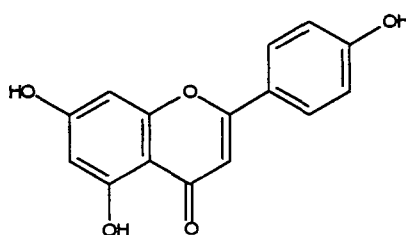
Interessante notar que, até o presente momento, não há relatos sobre a constituição química de extratos ou do óleo essencial destas drogas produzidas nas imediações de Curitiba. Sabe-se, por exemplo, que a camomila, em diferentes formas farmacêuticas, é comumente utilizada como medicamento de primeira escolha para o tratamento de inflamações cutâneas em bebês e crianças de tenra idade, tais como assaduras e crostas da cabeça que se desenvolvem em função da alimentação com leite (Eldin & Dunford 2001, Volhardt 2000).

Vários estudos têm demonstrado não só suas propriedades antiinflamatórias (Isaac 1979, Jakolev & Isaac 1979, Jakolev *et al* 1983, Glowania *et al* 1987, Safayhi *et al* 1994, Gerristein *et al* 1995, Ammon *et al* 1996), como também ações antipépticas (Szelenyi *et al* 1979), antialérgicas (Miller *et al* 1996), antiespasmódicas (Forster *et al* 1980, Mann & Staba 1986), antiflogística (Bradley 1992); antibacteriana (Aggag & Yousef 1972, Mann & Staba 1986, Molochko & Lastochkina 1990, Kedzia 1991, Lu *et al* 1998), antifúngica (Szalontai *et al* 1976, Szalontai *et al* 1977, Ahmed *et al* 1994), antiviral (Sugunda *et al* 1983), antitumoral (Wei *et al* 1990, Birt *et al* 1997, Chaumontet *et al* 1997), antioxidante (Rekka *et al* 1996) ansiolíticas e sedativas (Viola *et al* 1995, Avalonne *et al* 1996, Yamada *et al* 1996), revisado por Newall e colaboradores (1996). Recentemente, extratos de camomila e de calêndula demonstraram estimular a proliferação de linfócitos após estimulação com células alogênicas (Amirghofran *et al* 2000), efeito este que poderia ser explorado para a melhoria da resposta imune em pacientes imunodeprimidos.

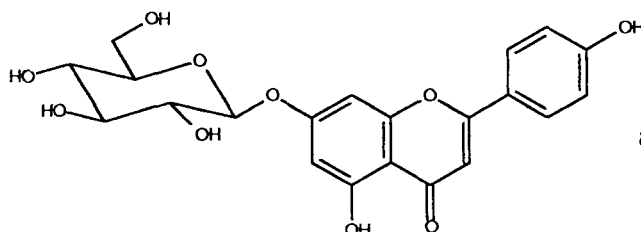
Sabe-se que os principais constituintes ativos da *Chamomilla recutita* (L) Rauschert são os componentes do óleo essencial como o camazuleno, bisabolol e seus derivados (Salamon 1992, Viola *et al* 1995), e os flavonóides, principalmente a apigenina e seus glicosídeos. O camazuleno tem sido relacionado à propriedades antiinflamatórias, tendo sido descrita sua interferência na síntese de LTB4 e de outros metabólitos do ácido araquidônico (Safayhi *et al* 1994), além de inibir a peroxidação lipídica, possuindo, também, efeitos antioxidantes (Rekka *et al* 1996). Propriedades antialérgicas e antiespasmódicas também já lhe foram atribuídas (Mann & Staba 1986).

O bisabolol e seus derivados compreendem aproximadamente 50% dos componentes do óleo essencial, e estão relacionados à propriedades antiinflamatórias, antibacteriano, antipiréticas e antifúngicas (Jakolev & Isaac 1979, Jakolev *et al* 1983, Kedzia 1991, Berry 1995, Ammon *et al* 1996). Já os espiroesteres *cis*- e *trans*-en-in-dicicloeter apresentam propriedades antialérgicas, provavelmente por inibirem parcialmente a degranulação de mastócitos (Miller *et al* 1996).

Os flavonóides apigenina (1) e apigenina-7-O-glucosídeo (2) possuem atividades carminativas, antiespasmódicas (Salamon 1992) e antiinflamatórias, esta última demonstrada em edema de pata de rato induzido por carragenina (Mascolo *et al* 1988), na diminuição da adesão de leucócitos ao endotélio e por inibição da síntese de IL-1 α , TNF- α e IL-8 (Gerristein *et al* 1995). Efeito sedativo da apigenina extraída da camomila foi recentemente descrito e parece ser resultante da interação deste composto com receptores benzodiazepínicos, onde inibiu competitivamente o acoplamento do ligante específico flunitrazepam em ratos (Viola *et al* 1995).



apigenina (1)
C₁₅H₁₀O₅ – PM 270



apigenina-7-O-glucosídeo (2)
C₂₁H₂₀O₁₁ – PM 448

Um aspecto interessante a ser considerado sobre a camomila é que, embora a literatura seja farta com referência às suas diversas atividades biológicas, a maioria dos estudos encontrados relatam essas propriedades testadas *in vivo*. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desta planta.

Portanto, a possibilidade de se realizar estudos que pudessem revelar a composição química básica da camomila produzida localmente e, de alguma forma, demonstrar a presença de alguma atividade biológica com a possibilidade de compará-la à uma amostra produzida dentro dos padrões recomendados, tomou esta investigação particularmente atraente.

Em contraste com a vasta literatura existente para a camomila, para as plantas *Rauvolfia sellowii* Muell. Arg., *Hybanthus bigibbosus* (St.-Hil.) Hassler e *Anchieta pyrifolia* (Mart.) G. Don, conhecidas popularmente como pau-pra-tudo, canela-de-veado e cipó-suma, respectivamente, estudos que pudessem delinear ou esclarecer aspectos importantes referentes às suas propriedades farmacológicas são escassos ou mesmo inexistentes. Essas plantas fazem parte de uma coleção de quinze espécies que foram selecionadas pelo seu amplo uso na medicina caseira durante um trabalho etnofarmacobotânico realizado recentemente com a população residente na área da Usina Hidroelétrica de Salto Caxias, sudoeste paranaense (Silva *et al* 2003).

Por exemplo, as raízes da canela-de-veado e as folhas do cipó-suma são consumidos por pacientes portadores de quadros alérgicos, além de ter-se registrado o uso deste também como depurativo (Silva *et al* 2003). Já as cascas do pau-pra-tudo são usadas na região pelos indivíduos diabéticos ou que necessitam diminuir os níveis séricos de colesterol (Silva *et al* 2003), além de seu uso como antihipertensivo (Batista *et al* 1995). Estudos recentes realizados em nossos laboratórios também demonstraram intensa atividade antioxidante de seu extrato hidroalcoólico (Menezes *et al* 2002).

Dessa forma, elas tornaram-se também alvo de nosso interesse, amparadas não só no fato de serem plantas muito usadas na medicina caseira,

mas e principalmente, porque suas indicações de uso estão, de uma forma ou de outra, relacionadas a aspectos envolvidos com a resposta inflamatória.

Este trabalho tem por finalidade descrever os estudos experimentais utilizados na investigação da atividade antiinflamatória, particularmente sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos, dos extratos hidroalcóolicos das cascas de pau-pra-tudo, das raízes e rizomas de canela-de-veado, das folhas de cipó-suma e dos capítulos florais de duas amostras de camomila, ambas obtidas no comércio local, mas de origens distintas.

O conjunto desses estudos contribuirá para o entendimento das bases científicas pelas quais o uso de plantas tradicionais em fitoterapia na área da inflamação é tão explorado pela população. Some-se ainda sua possível contribuição para o desenvolvimento de novos medicamentos de origem sintética e/ou semi-sintética.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Investigação do efeito dos extratos hidroalcóolicos de plantas medicinais sobre a atividade migratória de leucócitos humanos.

Objetivos específicos

- Padronização da técnica de migração leucocitária em Câmara de Boyden como modelo de ensaio biológico *in vitro*, usando a caseína como substância quimioatraente.
- Inibição da migração leucocitária usando a dexametasona como droga padrão.
- Avaliação do extrato hidroalcólico dos capítulos florais de camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), das cascas de pau-pra-tudo (*Rauvolfia sellowii* Muell. Arg), das raízes de canela-de-veado (*Hybanthus bigibbosus* (St.-Hil.) Hassler) e das folhas de cipó-suma (*Anchieta pyrifolia* (Mart.) G.Don) sobre a atividade migratória dos leucócitos *in vitro*.
- Contribuição para a elucidação do mecanismo de ação do extrato hidroalcólico de camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) sobre a inibição quimiotática de polimorfonucleares humanos estimulados por caseína – via receptor opióide.

MATERIAL E MÉTODOS

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck, salvo indicação contrária. Para as soluções, utilizou-se água ultra pura, obtida pelo sistema Milli Q (Millipore).

As soluções foram preparadas e em seguida esterilizadas (1) por calor úmido (autoclavação a 121°C, 30min, 1atm); (2) por meio de tindalização (3 a 6 ciclos de aquecimento a 60°C por 60min, seguido de resfriamento e conservação à temperatura ambiente por 24h) ou (3) por filtração (0.22µm – Acrodisc) e, posteriormente armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (T.A., 4 - 8°C ou a -20°C), ao abrigo da luz, conforme indicado.

Os solventes orgânicos utilizados para a preparação dos extratos dos fármacos vegetais foram purificados antes do uso (Amarego & Perinn 1996) e os demais reagentes de grau analítico foram obtidos de fornecedores, com certificado de garantia do seu grau de pureza.

1. SOLUÇÕES

1.1. Meios Líquidos

1.1.1. Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (Dacie & Lewis 1995)

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (150mmol/l), Na_2HPO_4 (150mmol/l), NaCl (154 mmol/l), em água. Após ajuste do pH para 7,2 - 7,4 com solução de NaOH 1N, procedeu-se a esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 - 8°C.

1.1.2. PBS suplementado (PBSs) (Bock & Mrowietz 2001)

PBS foi suplementado, em condições assépticas, na hora do uso, com albumina soro bovina (BSA) 0,25% (p/v), glucose 0,1% (p/v), CaCl_2 (0,9mmol/l) e MgCl_2 (0,5mmol/l).

1.1.3. Solução hemolisante de Gey

Solução A: NH_4Cl (654,20mmol/l), KCl (24,83mmol/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6,53mmol/l), KH_2PO_4 (0,88mmol/l), glucose (27,77mmol/l), vermelho de fenol (0,05g/l).

Solução B: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,06mmol/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,56mmol/l), CaCl_2 (3,42mmol/l).

Solução C: NaHCO_3 (26,78mmol/l).

O pH de cada solução foi ajustado para 7,2 - 7,4 com solução de NaOH 1N e os reagentes conservados a 4°C.

Na hora do uso a solução hemolisante foi preparada, em condições estéreis, na proporção de 4:1:1:14 para as soluções A, B, C e H_2O , respectivamente.

1.1.4. Solução de caseína a 5 % (p/v) (Siddiqui, et al 1999)

Caseína em pó foi dissolvida em PBS (50mg/ml) e aquecida a 56°C por 10min. A solução foi resfriada rapidamente a 4°C, centrifugada a 1300g por 5min para remoção de partículas insolúveis, aliquoteada e armazenada a -20°C, sendo descongelada apenas na hora do uso.

1.2. Meios semi-sólidos

Carboximetilcelulose (CMC - Synth) e hidroxietilcelulose (HEC - Aqualon), ambos a 2% (p/v), foram dissolvidos em PBSs sem albumina e aquecidos a 37°C sob constante agitação. Após total dissolução, as soluções foram deixadas à T.A.

para gelificação. Após tindalização, a esterilidade das soluções foi comprovada pela ausência de turvação ou crescimento de microorganismos após incubação a 37°C, por 48h.

2. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Cinco a quinze mililitros de sangue periférico de voluntários sadios ou com alterações hematológicas indicativas de infecção (neutrofilia, desvio nuclear à esquerda, presença de granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle) colhidos com EDTA-K₃ (Vacutainer) ou heparina (Liquemine, Roche 500 UI/ml), foram usados como fonte de leucócitos humanos. As amostras foram colhidas após consentimento livre e esclarecido (anexo I), aprovado pela Comissão de Ética Médica do Hospital Geral de Curitiba (HGeC) (anexo II) e ratificado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (anexo III).

3. ENRIQUECIMENTO E ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS HUMANOS

3.1. Sedimentação espontânea à T.A.

Sangue anticoagulado foi deixado em repouso por 2h à T.A. A camada celular superior, rica em leucócitos, foi transferida para tubo cônico contendo 50ml de solução lisante (seção 1.1.3). Após homogeneização, a amostra foi submetida à rotação contínua por 8min à T.A., centrifugada (5min/800g) e o sobrenadante desprezado. Os leucócitos foram submetidos à lavagem com PBS (5min/800g/T.A.), seguida da sua ressuspensão em PBSs.

3.2. Centrifugação

Sangue anticoagulado foi centrifugado por 25min/800g. A porção intermediária, rica em leucócitos, foi transferida para um tubo cônico contendo 50ml de solução lisante e os leucócitos recuperados como descrito no item anterior.

3.3. Macromoléculas (Testa & Molineux 1993)

CMC e HEC, na concentração final de 0,1% (p/v), foram adicionados à frações de sangue periférico anticoagulado. Após homogeneização, as amostras ficaram em repouso, à T.A., por 45min. A fração superior, rica em leucócitos, foi, então, transferida para tubo cônico contendo 50ml de solução hemolisante e os leucócitos recuperados como já descrito.

4. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES

A viabilidade dos leucócitos foi testada após cada processo de isolamento, assim como para avaliação de eventuais efeitos citotóxicos dos reagentes utilizados. Para tanto, usou-se o teste com azul de tripano, o qual baseia-se na habilidade que a membrana plasmática de células viáveis (vivas) possui de excluir o corante (Merchant *et al* 1964). Dessa forma, leucócitos isolados como descrito no item 3. foram diluídos em solução a 0,4% (p/v) de azul de tripano em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio de luz, com auxílio da câmara de Neubauer. Somente amostras contendo $\geq 95\%$ de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

5. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

A contagem total inicial de leucócitos foi realizada em contator automatizado CellDyn 3200 Abbot e sua diferencial foi realizada em extensões

sangüíneas coradas por May-Grünwald-Giemsa (Dacie & Lewis 1995). Após enriquecimento, a suspensão de leucócitos foi enumerada em Câmara de Neubauer tendo sido diluída em solução a 3% (v/v) de ácido acético glacial. Os leucócitos foram, então, ajustados para 10^6 células/ml.

6. POLARIZAÇÃO LEUCOCITÁRIA

O ensaio de polarização foi realizado com leucócitos obtidos de doadores sadios usando-se técnica semelhante à descrita por Haston e colaboradores (Haston & Wilkinson 1988). A morfologia celular de uma suspensão a 10^6 leucócitos/ml em PBSs enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) foi observada imediatamente ($t = 0$ min) e após incubação a 37°C , por 30 minutos ($t = 30$ min), para os tubos controle (sem caseína) e teste (na presença de caseína).

Anteriormente à visualização microscópica, as células foram fixadas em glutaraldeído (Sigma) a 2,5% (v/v) em PBS, por 5min, a 37°C . Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBSs. O efeito da polarização induzida pela caseína foi observado em microscópio Olympus CBX40 e registrado fotograficamente com o auxílio do Programa Image-Pro Plus 3.0.

7. MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA *IN VITRO*

A locomoção dos leucócitos em direção à caseína (quimiotaxia positiva) foi observada em Câmaras de Boyden (Lee *et al* 1999, Wilkinson & Haston 1988). Para isto, 200 μ l de concentrações crescentes (0-5%) de caseína (p/v) preparadas como descrito no item 1.1.4. foram adicionadas ao compartimento inferior das câmaras.

Filtros de policarbonato isentos de polivinilpirrolidona (Nuclepore; Neuroprobe), com poros de 5 μ m de diâmetro, foram usados para separar os compartimentos superior e inferior. Os compartimentos superiores foram

preenchidos com 200µl de suspensão de leucócitos a 10^6 /ml. As câmaras foram, então, incubadas a 37°C por 90min e o número de leucócitos que migraram ativamente para o compartimento inferior foram transferidos e contados com o auxílio de um hemocitômetro. Em alguns experimentos, esse tempo de incubação variou entre 30 e 120 minutos.

O monitoramento do movimento espontâneo dos leucócitos (controle), foi realizado de forma similar ao teste de quimiotaxia, porém com adição de PBSs no compartimento inferior da câmara.

8. CERTIFICAÇÃO DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Este ensaio foi realizado em três etapas (Tabela 2). Na primeira etapa, os leucócitos foram expostos a concentrações iguais de quimioatraente nos compartimentos superior e inferior da câmara de Boyden (1). Na segunda, os leucócitos foram submetidos a um gradiente positivo (2), onde soluções de caseína foram adicionadas em ambos os compartimentos das câmaras, porém com concentrações maiores nos compartimentos inferiores em relação aos superiores. Na última etapa, estabeleceu-se um gradiente negativo (3), adicionando-se maiores concentrações de caseína nos compartimentos superiores das câmaras. Após incubação por 90min à 37°C, o número de leucócitos que migrou para os compartimentos inferiores das câmaras de Boyden foi avaliado em hemocitômetro.

Tabela 2. Teste de certificação de migração para neutrófilos em diferentes concentrações e gradientes de caseína.

Caseína % (p/v)					
Comp. Superior	Comp. Inferior				
	0	0,01	0,05	0,1	0,5
0	(1)	(2)	(2)	(2)	(2)
0,01	(3)	(1)	(2)	(2)	(2)
0,05	(3)	(3)	(1)	(2)	(2)
0,1	(3)	(3)	(3)	(1)	(2)
0,5	(3)	(3)	(3)	(3)	(1)

(1) ausência de gradiente (2) gradientes positivos (3) gradientes negativos

9. INIBIÇÃO DA QUIMIOTAXIA LEUCOCITÁRIA INDUZIDA POR CASEÍNA

Em alguns experimentos, os leucócitos foram pré-tratados por 30 minutos com várias concentrações (0,1 a $10^3 \mu\text{g/ml}$) dos extratos de plantas ou com fosfato dissódico de dexametasona (DEXA) (Decadron-Prodome), de 10^{-7} a 10^{-3} M. E por 10 minutos com cloridrato de naloxona 0,4mg/ml (Narcan-rPr); 10^{-7} M e sulfato de morfina 10mg/ml (Dimorf®-Cristália), a 10^{-7} M, a 37°C, isolados ou em combinação. Em seguida, foram lavados (800g/5min), ressuspensos em PBSs e submetidos ao ensaio de quimiotaxia (item 7).

10. EXTRATOS DE PLANTAS

10.1. Material botânico e preparação dos extratos

As espécies medicinais usadas neste trabalho foram coletadas entre os meses de fevereiro e dezembro de 1998, na área onde situa-se a atual represa da usina de Salto Caxias (PR). Após serem identificadas e classificadas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (McNeill, *et al* 2000), exemplares de cada uma foram depositados no herbário do Departamento de Botânica da UFPR, como a seguir: cascas de *Rauvolfia sellowii* (Muller. Arg.) –

Apocynaceae (pau-pra-tudo), registro 42.384; raízes de *Hybanthus bigibbosus* (St.-Hil.) Hassler-Violaceae (canela-de-veado), registro 42.366 e folhas de *Anchieta pyrilifolia* (Mart.) G. Don - Violaceae (cipó-suma), sob registro 42.427.

Capítulos florais de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert - Asteraceae (camomila), de procedência nacional e importada (egípcia) adquiridos no comércio de Curitiba, foram submetidos à análise farmacognóstica recomendada pela Farmacopéia Brasileira IV (Farmacopéia 1996), e ambas as amostras depositadas no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da UFPR.

A extração do material botânico seco pulverizado (50g) foi feita por maceração com solução de EtOH 20% (200ml) por 48h. Os extratos foram filtrados, levados à secura por evaporação em banho-maria à 37°C, ressuspensos em PBS (20ml), esterilizados por filtração, aliquoteados e mantidos à -20°C.

10.2. Abordagem fitoquímica

A abordagem fitoquímica clássica realizada para todas as plantas estudadas baseou-se em ensaios descritos por Matos 1988, e envolveu:

10.2.1. Pesquisa de flavonóides

Cerca de 2g das drogas em pó foram levadas à fervura em solução de EtOH a 70% (v/v). Após serem filtradas, foram testadas para a presença de flavonóides usando-se a reação de Shinoda e a complexação com $AlCl_3$.

- Reação de Shinoda: ao extrato alcoólico foram adicionados fragmentos de magnésio metálico e, vagarosamente pelas paredes do tubo de ensaio, foi vertido HCl conc. (2ml). A positividade da reação (formação de cianidina) foi monitorada entre 15min e 24h após a reação, através do aparecimento de coloração vermelha no tubo reator.
- Reação com $AlCl_3$: áreas distintas de papel de filtro foram umedecidas (1) somente com gotas de extrato alcoólico, (2) gotas de extrato alcoólico juntamente com gotas de solução de $AlCl_3$ a 5% (p/v), (3)

somente gotas de solução de AlCl_3 a 5% (p/v), e observadas sob luz ultravioleta (366nm). A positividade da reação foi caracterizada pelo desenvolvimento de fluorescência na área umedecida com extrato alcoólico e solução de AlCl_3 a 5% (p/v), desprezando-se a fluorescência intrínseca do extrato alcoólico.

10.2.2. Pesquisa de alcalóides

Cerca de 2g das drogas em pó foram levadas à fervura com solução de H_2SO_4 (20ml) a 1% (v/v). Os filtrados foram alcalinizados (pH 9-10) com solução de amônia diluída (Farmacopéia 1959). A extração dos alcalóides foi feita com CHCl_3 . A fração clorofórmica foi transferida para uma cápsula de porcelana e o solvente evaporado em banho-maria (50°C). Ao resíduo, adicionou-se solução de H_2SO_4 a 1% (5ml) e procedeu-se às reações de caracterização de alcalóides com os reagentes de Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardart. A positividade das reações foi caracterizada pela formação de precipitado característico.

10.2.3. Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos

Cerca de 2g das drogas em pó foram levadas à fervura em solução a 25% de etanol (v/v) por 2min. Os filtrados foram acidificados (pH 4,0) com solução de H_2SO_4 a 5% (v/v), aquecidos e levemente resfriados. Para a extração, adicionou-se CHCl_3 e agitou-se cautelosamente. A camada orgânica foi transferida para um tubo de ensaio ao qual adicionou-se igual volume de amônia diluída. Após forte agitação, a mistura foi deixada em repouso e a presença de glicosídeos antraquinônicos confirmada pela formação de cromóforo avermelhado na camada aquosa.

10.2.4. Pesquisa de taninos

Cerca de 2g das drogas em pó foram levadas à fervura em água destilada (10ml) por aproximadamente 3min. Ao filtrado, adicionou-se quantidade suficiente de água destilada para 20ml. Às alíquotas (5ml) do extrato hidroalcolico resultante, adicionou-se (1) gotas de solução de gelatina a 2% (v/v), (2) gotas de solução a 5% de cloridrato de quinina, (3) gotas de solução a 10% (v/v) de $\text{Pb}(\text{AcO})_2$, (4), gotas de solução a 4% de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ e (5) gotas de solução a 10% de FeCl_3 . A positividade dessas reações foi evidenciada pela presença de turvação e/ou precipitação e, na reação com FeCl_3 , pela precipitação azul para taninos hidrolisáveis, ou verde, para taninos condensados.

10.2.5. Pesquisa de saponinas

Cerca de 2g das drogas em pó, em água deionizada (10ml), foram submetidas à agitação vigorosa por 15s. Em seguida, os tubos de ensaio foram deixados em repouso à T.A. e observou-se a positividade da reação através da formação de espuma persistente por, pelo menos, 15min.

10.2.6. Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos

Cerca de 2g das drogas em pó foram levadas à fervura em solução de EtOH a 70% (v/v) por aproximadamente 2min. Aos extratos alcoólicos, foram adicionados água destilada (10ml) e solução de $\text{Pb}(\text{AcO})_2$ a 10% (v/v) (0,2ml) para precipitação de proteínas e taninos. Após forte agitação e breve repouso, as amostras foram filtradas e adicionadas de CHCl_3 (8ml). Para extração dos glicosídeos, a camada clorofórmica foi distribuída em duas cápsulas e os extratos clorofórmicos levados à secura em banho-maria. A seguir, procedeu-se:

- Reação de Keller-Killiani: adicionou-se o reativo de Keller (AcOH glacial/ solução a 5% de FeCl_3) e após homogeneização, a mistura foi vertida lentamente para um tubo de ensaio contendo reativo de Killiani

(H₂SO₄ conc.). A positividade da reação foi evidenciada pela formação de anel castanho avermelhado na zona de contato entre as fases.

- Reação de Pesez: adicionou-se gotas de H₃PO₄ conc. e a mistura homogeneizada foi observada sob luz ultravioleta. A formação de um precipitado amarelo-esverdeado fluorescente demonstra a presença de glicosídeos cardiotônicos.

10.3. Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial de capítulos florais das espécies de camomila foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger para essências menos densas do que a água.

10.4. Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso modelo HP 6890 acoplado à espectrometria de massa (CG-EM) com coluna capilar 5% fenil / 95% metilsiloxano (HP-5MS) e Hélio (He) como gás de arraste, num fluxo de 1ml/minuto. O forno atingiu a temperatura de 40-250°C, sendo a taxa de aquecimento de 4°C/min. O óleo essencial (100µl) foi diluído em EtOH P.A. (900µl) e injetado 1µl de amostra na razão de Split 100:1.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm 1 erro padrão da média (EPM) quando $n \geq 3$ e \pm 1 desvio padrão (DP) quando $n = 2$. Para análise estatística dos resultados foram usados os testes ANOVA – Tukey HSD - $\alpha = 0,05$, ANOVA – LSD - $\alpha = 0,05$, análise de regressão binomial e teste *t* de Student, quando indicado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta inflamatória envolve várias etapas com o objetivo maior de recrutar populações celulares distintas, capazes de eliminar o agente causal, com concomitante reparo do tecido lesado. Quando este processo torna-se exacerbado, ultrapassando os seus efeitos salutares, há a necessidade de se usar agentes que interfiram em uma ou mais dessas etapas.

Muitas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional não só pela sua eficiência em atenuar ou mesmo eliminar os efeitos indesejáveis da resposta inflamatória, mas também pela facilidade de acesso e, principalmente, pelo seu baixo custo. Neste trabalho em particular, investigou-se o potencial das plantas popularmente conhecidas como camomila, pau-pra-tudo, canela-de-veado e cipó-suma em interferir no recrutamento de fagócitos, etapa fundamental da resposta inflamatória, usando-se o método de Boyden como modelo experimental.

Para tanto, foram utilizadas populações distintas de leucócitos humanos. A primeira foi proveniente de indivíduos saudáveis, que concordaram em participar deste projeto como voluntários (grupo I) e a outra, de pacientes ambulatoriais que procuraram o Serviço de Análises Clínicas do Hospital Geral de Curitiba para a realização de hemogramas, requisitados em função de uma clínica compatível com um estado infeccioso e/ou inflamatório (grupo II).

As alterações quantitativas e qualitativas dos leucócitos usadas para definir os grupos I e II estão resumidas na Tabela 3, e consistiram, para o grupo I, do número total de leucócitos/l de sangue total e da percentagem de mononucleares e granulócitos dentro dos valores de referência para uma população normal (Miale 1982). Para pertencer ao grupo II, os pré-requisitos foram a presença de leucocitose acompanhada de neutrofilia, com ou sem a presença de desvio nuclear à esquerda (bastonetes) associadas ou não à presença de granulação tóxica ou vacuolização do citoplasma ou corpúsculos de Döhle nos PMN (neutrófilos tóxicos) (Lee *et al* 1999).

Tabela 3. Características laboratoriais das amostras sanguíneas das populações utilizadas no estudo de migração leucocitária.

GRUPO	Leucócitos ($\times 10^9/l$)	MNC (%)	PMN (%)	DNE	GT	VC	CD
I	4,0 – 8,0	≥ 30	≤ 70	-	-	-	-
II	$> 10,0$	≤ 10	≥ 90	+/-	+/-	+/-	+/-

Grupo I: voluntários sadios; Grupo II: pacientes com características de infecção; MNC: células mononucleares; PMN: polimorfonucleares; DNE: desvio nuclear à esquerda; GT: granulações tóxicas; VC: vacuolização citoplasmática; CD: corpúsculos de Döhle.

Obtenção e isolamento de leucócitos humanos

Com o objetivo de obter-se leucócitos com morfologia esférica (não estimulados) e livres de contaminantes, importantes para os ensaios que avaliam o comportamento locomotor, as amostras de sangue periférico colhidas em EDTA-K₃ ou heparina (item 2) foram submetidas a três métodos de enriquecimento: sedimentação espontânea, centrifugação ou misturadas com soluções de macromoléculas (item 3). Após concentração na parte superior do tubo, a camada de leucócitos foi removida e submetida à lise osmótica com solução de Gey (item 1.1.3) para eliminação de eritrócitos contaminantes. Em seguida, a morfologia e a viabilidade dos leucócitos foram observadas sob microscopia comum, após sua ressuspensão em solução de azul de tripano (item 4).

Quando comparados, o método de centrifugação foi o que apresentou uma quantidade de leucócitos esféricos bastante superior em relação aos demais, com presença de leucócitos viáveis (incolores), esféricos, e refringentes (Figura 6/A) superior a 95% após tratamento com azul de tripano, em contraste com os danificados ou mortos, que apresentavam-se parcial ou totalmente corados em azul (Figura 6/B). Dessa forma, o método de centrifugação foi o eleito para se

obter uma população de leucócitos predominantemente não ativados para todos os estudos subsequentes constantes neste trabalho.

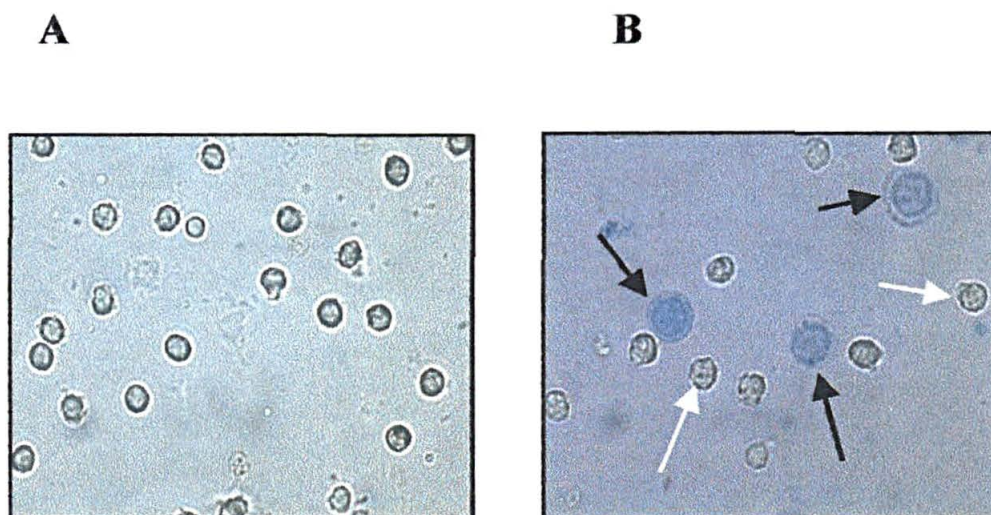


Figura 6. Morfologia e viabilidade celulares. (A) Polimorfonucleares (PMN) obtidos de sangue periférico (item 2) ressuspensos em tampão PBS suplementado (item 1.1.2) foram transferidos para um hemocitômetro e sua morfologia observada sob microscopia de luz. (B) A percentagem de células viáveis foi avaliada através da diluição dos PMN em solução de azul de tripano a 0,4% (item 4) e transferidos para um hemocitômetro. Após 3-5 minutos, a preparação foi examinada sob microscopia de luz e as células viáveis (*setas brancas*) distinguidas das não viáveis (*setas pretas*).

Polarização leucocitária

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do hospedeiro, sendo as primeiras células a chegar nas áreas de lesão. Aí, desempenham inúmeras funções com a finalidade de eliminar o agente agressor. A locomoção por si só envolve uma série de fases como previamente revisto na introdução desta dissertação, incluindo alterações das propriedades de adesividade, de forma e de orientação da célula em estudo.

Quando em presença de um agente estimulante, a polaridade morfológica, ou a alteração da forma, são respostas imediatas das células que se encontram em suspensão, e independem da sua adesão a um substrato. Há uma série de ensaios que permitem observar essas alterações, os quais devem ser usados preliminarmente ao se questionar as habilidades locomotoras de uma substância. Estes, quando positivos, constituem o primeiro indício experimental para o reconhecimento do potencial quimiotático de uma substância (Wilkinson 1998).

Com a finalidade de investigar a capacidade da caseína em induzir alterações no comportamento locomotor de leucócitos humanos, realizou-se o ensaio de polarização, usando metodologia semelhante à descrita por outros autores (Zigmond 1977, Zigmond 1978, Wilkinson 1988b, Wilkinson 1996), onde a morfologia de leucócitos em solução de PBSs, obtidos de voluntários sadios, foi observada imediatamente ($t = 0\text{min}$) e após 30 minutos de incubação ($t = 30\text{min}$), na presença e ausência de caseína (item 6).

Como demonstrado na Figura 7, a morfologia esférica inicial das células em suspensão (Figura 7/A) foi imediatamente alterada pela presença de caseína (Figura 7/B). Essa morfologia irregular acentuou-se ainda mais ao final dos 30 minutos de incubação a 37°C , em contraste com a população não tratada (Figura 7/C), a qual permaneceu predominantemente esférica. O efeito polarizador da caseína pode ser observado com clareza pela formação de projeções citoplasmáticas agudas, lembrando pseudópodos, levando à morfologia característica, com alongamento da célula na forma cabeça-cauda (Figura 7/D).

Esses resultados demonstraram que a caseína utilizada teve a habilidade de polarizar a maioria dos leucócitos humanos testados em suspensão, sugerindo comportamento similar ao descrito para outras substâncias quimiotáticas (Haston & Wilkinson 1988). Além disso, tomou factível seu uso para testes de quimiotaxia *in vitro*.

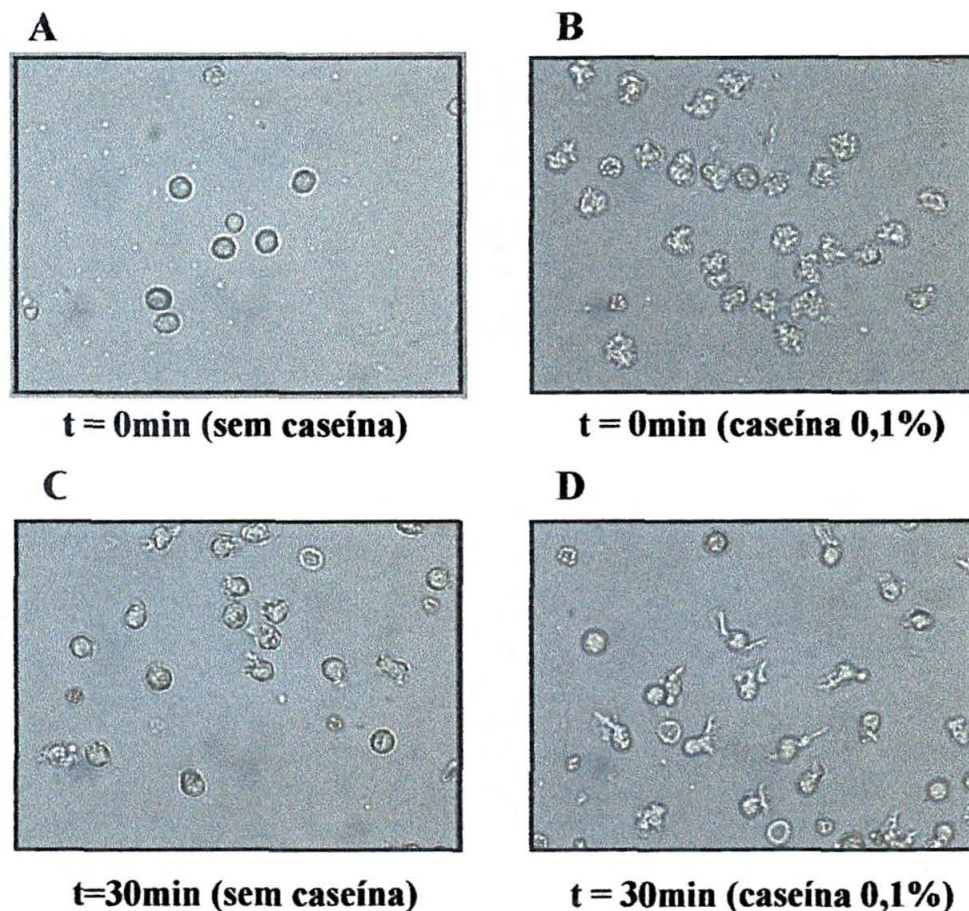


Figura 7. Polarização leucocitária induzida por caseína. As fotomicrografias mostram leucócitos humanos fixados em glutaraldeído após serem ressuspensos em PBSs suplementado com 10% de soro bovino fetal (**A**) e em presença de caseína 0,1% (**B**). Após 30 minutos de incubação a 37°C, polarização celular na forma de projeções citoplasmáticas pôde ser observada na população tratada com caseína (**D**), contrastando-se a forma alongada com a original, esférica, da população incubada na ausência de caseína (**C**).

Migração leucocitária

O deslocamento dos leucócitos da circulação para os tecidos é um passo essencial em todos os tipos de resposta inflamatória. Estudos de locomoção revelam que tanto neutrófilos como eosinófilos, basófilos e fagócitos mononucleares exibem migração direcional sob influência de agentes quimiotáticos, embora seja necessário um gradiente de concentração para que ocorra a migração (Lee *et al* 1999).

Tendo a caseína induzido polarização e baseando-se em seus efeitos amplamente conhecidos sobre a atividade locomotora de leucócitos, particularmente os de humanos (Zigmond 1977, Wilkinson 1979, Solymossy *et al* 1986, Wilkinson 1988a, Wilkinson 1998, Wang *et al* 2001), prosseguiu-se na investigação do seu potencial quimiotático com a finalidade de estabelecer condições otimizadas para um ensaio de migração que pudesse mimetizar, *in vitro*, o recrutamento de leucócitos observado durante processos inflamatórios.

Com este objetivo, utilizou-se a câmara de Boyden como modelo experimental. Neste ensaio, avalia-se a habilidade das células em migrar ativamente, através de filtros de natureza e espessura variáveis, mas porosidade inferior ao diâmetro celular, por um período de tempo pré-estabelecido, em resposta a gradientes de concentração da substância quimiotática de interesse. As células migradas para dentro do filtro ou para o compartimento inferior do sistema são enumeradas e este valor é comparado àquele onde houve migração na ausência de gradiente (controle), levando à determinação da atividade quimiotática (Boyden 1962).

Em nossos experimentos, filtros de polycarbonato de 12 μ m de espessura e contendo poros de 5 μ m de diâmetro foram utilizados para separar os dois compartimentos da câmara. Necessário se faz ressaltar que, com a espessura desses filtros, as células não migram para dentro dele, como ocorre com filtros de éster de celulose, mas passam através de seus poros, sendo recuperadas no compartimento inferior do sistema. Suspensão de leucócitos humanos dos grupos I (sadios) e II (infeccioso) foram adicionadas ao compartimento superior, enquanto concentrações crescentes de caseína (0,01 a 5%, p/v) preencheram o compartimento inferior, com a finalidade de se determinar a concentração ideal desta para induzir máxima migração.

O efeito da caseína no recrutamento de leucócitos humanos apresentou uma relação dose-dependente direta e significativa para os grupos testados até a concentração de 1 e 2,5% para os grupos I e II, respectivamente quando comparados às populações estudadas na ausência de caseína. Este perfil de resposta foi semelhante ao descrito por outros autores (Gattegno *et al* 1988, Fiat

et al 1991) e, embora similar para os grupos testados, a intensidade das respostas foi marcadamente diferente. Para o grupo I, aumento significativo na migração ocorreu a partir da concentração de 0,5% de caseína, enquanto que, para o grupo II, esse efeito iniciou-se numa concentração dez vezes menor, ou seja, a 0,05% ($p \leq 0,001$; $n = 2 - 7$).

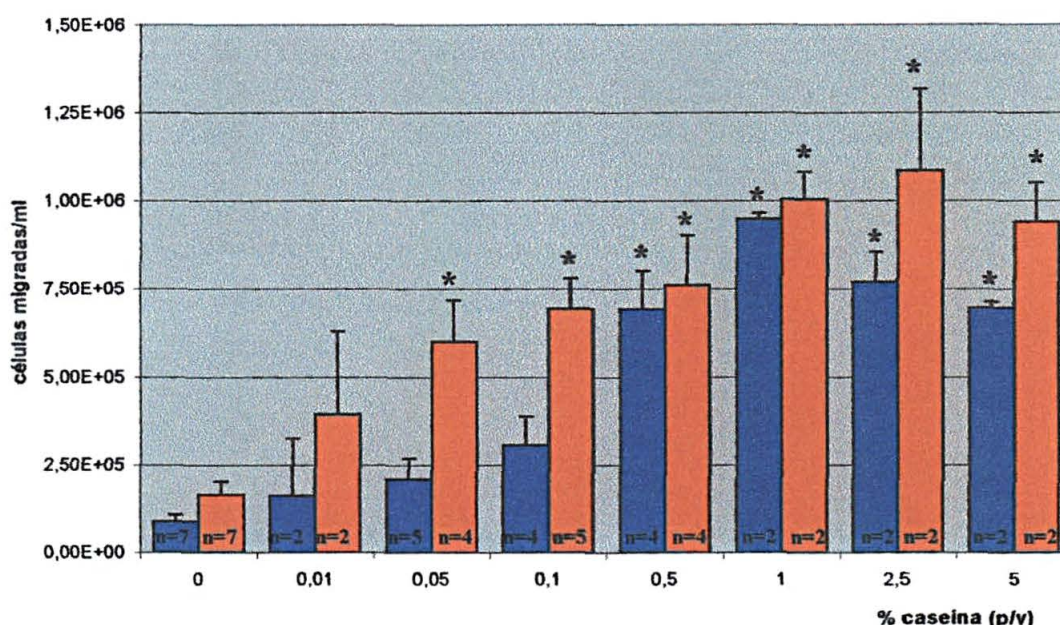


Figura 8. Migração de PMN induzida por caseína. Leucócitos obtidos de doadores sadios■ e de portadores de neutrofilia■ foram estimulados a migrar frente a diferentes concentrações de caseína, por 90 minutos, a 37°C, usando câmara de Boyden. As colunas representam o número de PMN migrados/ml ($n = 2 - 7$; * $p \leq 0,001$ – ANOVA – Tukey).

É provável que as diferentes respostas observadas para essas duas populações estejam relacionadas à origem das células ensaiadas. Enquanto os leucócitos do grupo I eram provenientes de voluntários sadios, os do grupo II pertenciam a uma população heterogênea de pacientes, cujo hemograma era indicativo de um estado infeccioso (Tabela 3).

Sabe-se que durante um processo inflamatório, muitos mediadores químicos são produzidos e que, muitos deles, têm a função de estimular a quimiotaxia leucocitária (Cotran *et al* 1994). Portanto, é possível que, para as células do grupo II, a presença de um estado inflamatório prévio tenha influenciado o seu comportamento *in vitro*, tornando-as mais prontamente responsivas ao estímulo quimiotático.

Nesse contexto, vários estudos têm demonstrado que leucócitos respondem de formas diferentes a estímulos quimiotáticos, dependendo de estarem ou não sensibilizados e/ou ativados pela presença de citocinas inflamatórias (Shalaby *et al* 1985, Ozaki *et al* 1987, Nathan 1989) ou outras substâncias (Lomas *et al* 1991). Por exemplo, Hill e colegas relataram que neutrófilos de pacientes com infecções estreptocócicas de pele (Hill *et al* 1974b), assim como os de pacientes jovens portadores de infecções bacterianas sistêmicas (Hill *et al* 1974a) apresentaram aumento da locomoção *in vitro*. Semelhante efeito foi também observado para leucócitos provenientes de pacientes com infecções por *Mycoplasma pneumoniae* (Martin *et al* 1973) e daqueles de pacientes apresentando pirexia e leucocitose, porém sem DNE, devido à infecções piogênicas severas (Krukowski 1978).

Por outro lado, é possível que essa diferença de respostas entre os grupos estudados esteja associada, também, a um nível mínimo de concentração de quimioatraente necessário para desencadear o mecanismo quimiotático para células estáticas, como as presentes no grupo I. Ou seja, neste grupo observa-se que a resposta quimiotática é muito semelhante para as concentrações entre 0,01 e 0,1%, e inferior quando comparada às obtidas nas concentrações $\geq 0,5\%$ de caseína.

Ainda com referência ao efeito quimiotático induzido pela caseína sobre leucócitos humanos em nossos estudos, há outros dois aspectos interessantes que devem ser destacados. O primeiro relaciona-se ao perfil da curva dose-resposta obtida, a qual demonstrou um aspecto em forma de sino. Este tem sido descrito como característico para as quimiocinas, quando submetidas a ensaios semelhantes, as quais interagem com receptores associados ao complexo

proteína G numa relação dose-dependente direta, seguida da diminuição do efeito na presença de concentrações elevadas do ligante (Schall 1994).

A queda de resposta em concentrações supra-ótimas de quimiocinas tem sido justificada pelo processo de dessensibilização de receptores, os quais, após ativação repetida, tornam-se refratários a novos estímulos, num fenômeno conhecido como dessensibilização homóloga (insensível ao mesmo ligante que induziu o estímulo) ou dessensibilização heteróloga (insensível a outros ligantes que utilizam o mesmo receptor) (Savarese & Fraser 1992, Foxman *et al* 1997, Baggiolini 1998).

De acordo com nossos resultados, é possível que a caseína possa ter induzido quimiotaxia nos leucócitos humanos de forma semelhante ao proposto para as quimiocinas, ligando-se a receptores metabotrópicos disponíveis na superfície dos leucócitos, até sua saturação, quando tornaram-se, então, insensíveis a novos gradientes de quimioatração. O uso de uma substância que, especificamente, bloqueie uma ou mais interações do complexo proteína G com a caseína, como por exemplo a toxina pertussis (Bokoch 1995), poderia ser útil no esclarecimento desta hipótese.

O segundo aspecto importante é com relação à população celular recuperada nos compartimentos inferiores da câmara de Boyden após quimiotaxia. Citocentrifugados desse material mostraram a presença predominante (>95%) de granulócitos em relação à população inicial (Figura 9), constituída por um número variável de eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e, principalmente, PMN.

Embora a caseína tenha a habilidade de induzir quimiotaxia tanto em PMN como em monócitos (Wilkinson 1988a, Wilkinson 1996, Wilkinson 1998), a ausência desses deve-se, provavelmente, a um impedimento físico para sua migração, uma vez que os filtros de policarbonato utilizados possuem porosidade de 5µm, muito inferior ao seu diâmetro (12-20µm) (Lee *et al* 1999). Além disso, é possível que, para monócitos, concentrações superiores de caseína sejam necessárias para promover efeito semelhante ao causado em PMN, como descrito para o peptídeo α MLP (Wilkinson 1988a).

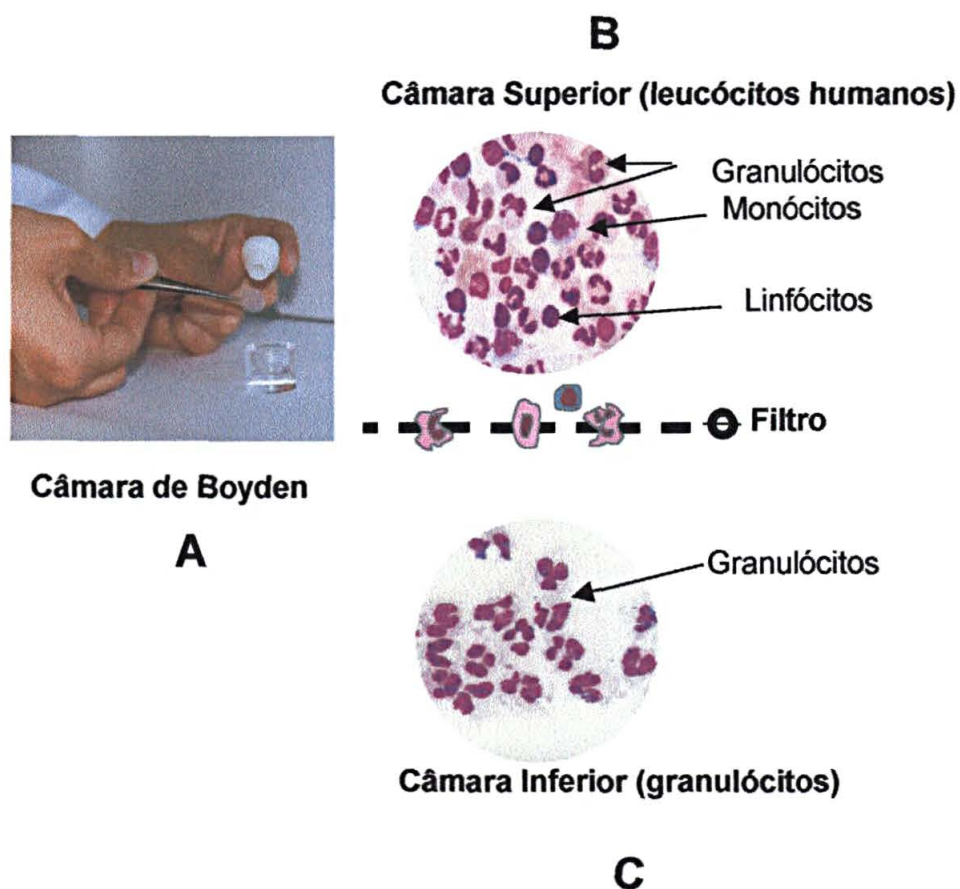


Figura 9. Caseína induz preferencialmente a migração de granulócitos. Câmaras de Boyden (A) contendo leucócitos humanos em suspensão em seu compartimento superior (B) e solução de caseína a 1% no inferior (C), foram incubadas a 37°C por 90 minutos. Citocentrifugados preparados das células recuperadas no compartimento inferior demonstraram a presença predominantemente de granulócitos (>95%), quando comparadas com a população inicial, constituída por granulócitos, monócitos e linfócitos.

Por outro lado, a presença de receptores para caseína foi descrita somente na superfície de PMN e monócitos (Lewis & Van Epps 1983), mas não em linfócitos, justificando a ausência deste tipo celular em nossos achados citológicos.

Paralelamente aos ensaios para estabelecer a concentração ideal de caseína para as nossas condições experimentais, diferentes períodos de incubação foram avaliados com a finalidade de estabelecer o tempo mínimo necessário para obter-se o máximo de efeito migratório. Para tanto, leucócitos dos grupos I e II ($10^6/\text{ml}$) foram adicionados ao compartimento superior das câmaras e

induzidos a migrar contra um gradiente de 0,5% de caseína por 30, 60, 90 e 120 minutos.

Conforme demonstrado na Figura 10, um número máximo de células foi recuperado no compartimento inferior da câmara para ambas as populações testadas após 90 minutos de incubação (>70 e 90% do inóculo para os grupos I e II, respectivamente), o qual permaneceu inalterado mesmo aos 120 minutos. Porém, este número foi mais expressivo para as populações celulares provenientes do grupo II. Esses resultados vêm não só confirmar os resultados previamente relatados neste trabalho, mas também reforçar a hipótese de que um estado de ativação prévio dessa população parece tornar a resposta migratória induzida pela caseína mais eficiente, pelo menos *in vitro*.

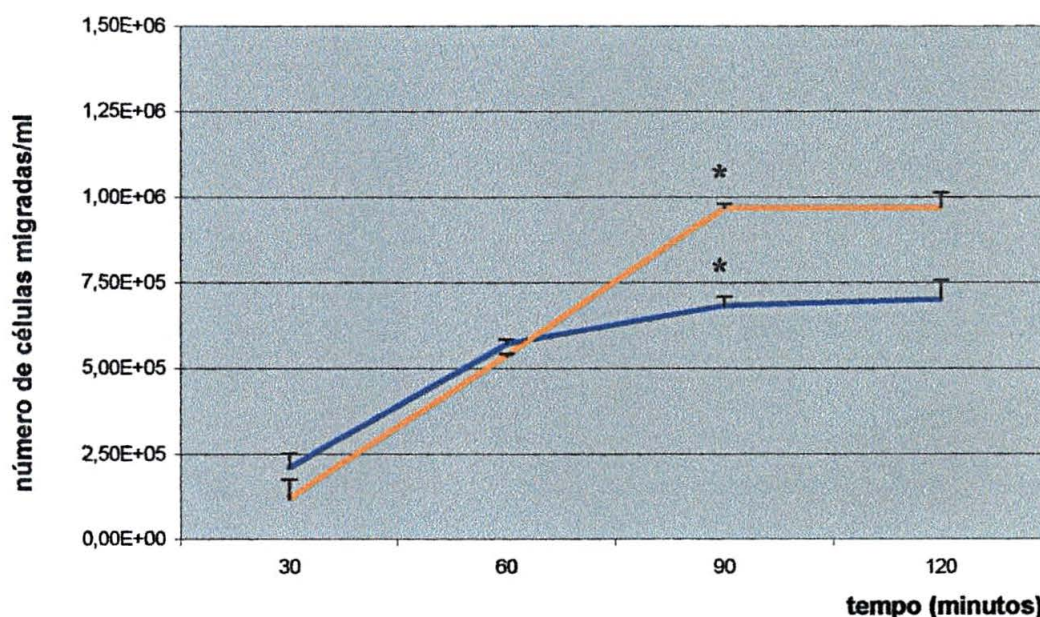


Figura 10. Tempo de migração de PMN induzida por caseína. Leucócitos obtidos de doadores saudáveis ■ e de portadores de neutrofilia ■ foram estimulados a migrar em câmara de Boyden, frente a 0,5% de caseína em diferentes tempos de incubação, a 37°C. As linhas representam o número de PMN migrados/ml (n=2, * $p \leq 0,01$ – Análise de regressão binominal).

Certificação de migração

Muitas vezes é impossível distinguir, *in vitro*, se uma substância pode induzir, em uma determinada população celular, quimiocinese (aumento da velocidade de movimentação), quimiotaxia (movimentação direcional) ou, o que é mais provável, a combinação de ambas. Com os experimentos anteriores, foi possível observar que a caseína interferiu, de algum modo, sobre o sistema locomotor dos leucócitos testados, pois induziu tanto polarização como migração celular.

Porém, esses ensaios refletem a ação locomotora de células estimuladas, neste caso pela caseína, não permitindo diferenciar entre uma migração direcional (quimiotaxia) e um movimento acelerado (quimiocinese). Essa distinção pode ser feita quando utilizam-se testes de certificação da migração, como o proposto originalmente por Zigmond. Nesse ensaio, filtros de éster de celulose são utilizados para separar os dois compartimentos da câmara. Uma suspensão de células adicionada ao compartimento superior é exposta tanto à concentrações equimolares (ausência de gradiente) quanto à concentrações crescentes de quimioatraente, gerando gradientes de concentração ora positivos, ora negativos entre os compartimentos (Zigmond 1988). Os efeitos quimiotáticos e/ou quimiocinéticos são, então, medidos pelo perfil da quantidade de células que migram para dentro do filtro separador em direção aos gradientes e pela distância por elas percorrida (Zigmond 1988).

Com o objetivo de evidenciar e confirmar os efeitos quimiocinéticos e quimiotáticos da caseína sobre a atividade locomotora dos leucócitos humanos, procedeu-se ao ensaio de certificação. Porém, introduziu-se duas modificações no método original proposto. A primeira, foi a utilização de filtros de polycarbonato com 12 μ m de espessura em substituição aos filtros de éster de celulose que possuem 150 μ m de espessura. A segunda foi a de que o número de células recuperadas no compartimento inferior das câmaras foi usado para avaliar o perfil cinético das respostas, uma vez que o diâmetro dos PMN (10-15 μ m) permite sua passagem ativa pelos filtros de polycarbonato.

Para tanto, leucócitos humanos ($10^6/\text{ml}$) foram ressuspensos ou em PBSs (controle) ou em PBSs contendo diferentes concentrações de caseína imediatamente antes de serem transferidos para o compartimento superior da câmara de Boyden e serem submetidos ao ensaio de quimiotaxia. Diferentes concentrações de caseína foram previamente adicionadas aos compartimentos inferiores das câmaras, estabelecendo-se, dessa forma, distintos e variáveis gradientes de concentração. A Tabela 4 ilustra com mais detalhes esses procedimentos.

Tabela 4. Efeito de gradientes de concentração de caseína sobre a migração de leucócitos humanos

Comp. Superior	Caseína (%)				
	Comp. Inferior				
	0	0,01	0,05	0,1	0,5
0	0,28x10 ⁵	2,28 x10 ⁵	3,62x10 ⁵	4,74x10 ⁵	6,16x10 ⁵
0,01	0,43 x10 ⁵	2,60 x10 ⁵	2,76 x10 ⁵	3,83 x10 ⁵	5,19 x10 ⁵
0,05	0,20 x10 ⁵	0,50 x10 ⁵	1,42 x10 ⁵	1,94 x10 ⁵	3,98 x10 ⁵
0,1	0,34 x10 ⁵	0,12 x10 ⁵	0,64 x10 ⁵	2,10 x10 ⁵	4,62 x10 ⁵
0,5	0,12 x10 ⁵	0,40 x10 ⁵	0,68 x10 ⁵	1,50 x10 ⁵	3,52 x10 ⁵

Diferentes concentrações de caseína foram adicionadas aos compartimentos superior e inferior das câmaras de Boyden, conforme indicado. Após 90min a 37°C, as células provenientes do compartimento superior que foram recuperadas no compartimento inferior foram contadas em hemocítômetro. Os dados representam os valores encontrados para 1 experimento. Os valores grafados em azul demonstram efeito quimiotático positivo; os valores em preto demonstram efeito quimiotático negativo e a linha diagonal vermelha, ausência de gradiente (efeito quimiocinético).

Nossos resultados quanto ao comportamento migracional observado sugerem que a presença de concentrações crescentes de caseína somente nos compartimentos inferiores (1ª linha horizontal da tabela) induziram migração de PMN, cuja intensidade foi diretamente proporcional à dose testada, assemelhando-se à performance dos resultados obtidos previamente, indicando predominância de atividade quimiotática. Em contraste, a presença dessas

mesmas concentrações somente nos compartimentos superiores, levou a uma apreciável diminuição desse efeito (1ª coluna, à esquerda da tabela), reforçando a forte quimioatração da caseína sobre os leucócitos humanos.

Por outro lado, a presença de concentrações de caseína nos dois compartimentos, porém criando gradientes positivos, ou seja, maior concentração de caseína nos compartimentos inferiores em relação aos superiores, levou a um aumento da migração dos PMN proporcional à intensidade do gradiente, porém não tão eficiente quanto ao observado no caso anterior. Quando estabeleceu-se um gradiente negativo, isto é, maiores concentrações de caseína nos compartimentos superiores em relação aos inferiores, observou-se diminuição da migração, também proporcional à intensidade dos gradientes.

Entretanto, o efeito quimiocinético pode ser melhor observado na linha diagonal central da Tabela 4 (em vermelho) onde, em cada ponto, as células encontravam-se na presença de caseína, mas na ausência de gradiente de concentração. A simples presença de caseína no compartimento superior já é suficiente para estimular a movimentação celular (efeito quimiocinético), a qual aumenta, proporcionalmente, com o aumento da concentração desse quimioatraente e que se reflete no aumento moderado da atividade quimiotática.

Em síntese, este experimento demonstrou que, na presença de gradientes positivos de caseína, a tendência de migração direcional dos leucócitos humanos é muito maior e diretamente proporcional à intensidade do gradiente, sugerindo predominância de efeito quimiotático (em azul). Por outro lado, na presença de gradientes negativos, a tendência de migração foi bastante menor e inversamente proporcional ao gradiente do quimioatraente, com predomínio de um efeito concentrador de células onde este é maior (em preto na tabela). Esses resultados contrastaram com um efeito migracional moderado observado quando havia concentrações idênticas de quimioatraente nos dois compartimentos (ausência de gradiente).

Embora os resultados prévios tivessem demonstrado que a caseína portou-se como uma substância capaz de induzir polarização e migração nas populações leucocitárias testadas, os resultados obtidos com o ensaio de

certificação acima descrito asseguraram que a atividade migratória induzida pela caseína é direcional, validando nossos experimentos de quimiotaxia.

Os mecanismos pelos quais a caseína induz recrutamento celular são, há muito, objeto de investigação. Alguns deles referem-se às características físico-químicas da molécula. Primeiro, pela sua conformação tridimensional característica (Wilkinson 1972, Lewis & Van Epps 1983, Farrell *et al* 2002), a qual difere de outras proteínas globulares que apresentam essa mesma conformação somente após desnaturação. De fato, o potencial quimiotático, por exemplo, da soroalbumina bovina só se torna evidente após sua desnaturação (Wilkinson 1988a).

Segundo, pela presença de algumas regiões hidrofóbicas e grupamentos fosfato na molécula, os quais, por levarem a uma interação mais facilitada entre a caseína e a bicamada fosfolipídica da membrana celular, excitariam a resposta locomotora nos leucócitos (Wilkinson 1974b, Lewis & Van Epps 1983, Wilkinson 1988a). Dentro desse contexto, a caseína, rica em grupamentos não polares, ligar-se-ia à membrana leucocitária, e essas interações hidrofóbicas entre receptores celulares e quimioatraentes contribuiriam para com a quimiotaxia (Solymossy *et al* 1986).

Um terceiro mecanismo proposto para a ação quimiotática da caseína, estaria na sua habilidade de induzir síntese de IL-8 pelos neutrófilos, a qual seria gerada durante a quimiotaxia, como resultado de um processo de ativação celular secundário à migração (Siddiqui *et al* 1999). Neste contexto, PMN que, *in vitro*, efetivamente migram em resposta a um gradiente de caseína expressam elevados níveis de IL-8 quando comparados àqueles somente expostos ao peptídeo (Siddiqui *et al* 1999). Corroborando com estes achados, níveis muito mais elevados de RNAm para IL-8 também foram observados tanto em PMN humanos (Siddiqui *et al* 1999) como em células de coelhos (Mori *et al* 1994) após migração estimulada por caseína quando comparados à população inicial.

Uma das propriedades mais conhecidas desta citocina é sua forte ação amplificadora da resposta inflamatória por recrutar ativamente elementos celulares, particularmente PMN, para o foco de lesão (Furie & Randolph 1995,

Baggiolini 1998). Acredita-se que mediadores químicos presentes no foco inflamatório inicial produzam uma primeira onda de gradiente, que atrai PMN. Estes, por sua vez, ativados pelo gradiente gerado, respondem com sua função locomotora. Simultaneamente à quimiotaxia, essas células gerariam também IL-8, a qual amplificaria a resposta inflamatória pelo recrutamento adicional de células para a área afetada.

Dessa forma, a IL-8 parece atuar como fator diretamente responsável pela quimiotaxia dos PMN induzida pela caseína, de duas formas: uma parácrina, ao recrutar células para o foco inflamatório e potencializando outras funções celulares importantes na resposta inflamatória, e a outra, autócrina, onde os próprios PMN, agora ativados, produziram mais IL-8. Esta os manteria neste estado ativado e, ao ser secretada para o meio, ativaria e atrairia outras células, fechando o ciclo amplificador.

Inibidores da quimiotaxia leucocitária induzida por caseína

Os glicocorticóides, e em particular a dexametasona (DEXA), estão entre as drogas mais potentes usadas no tratamento de doenças de natureza alérgica e inflamatória. Embora seus mecanismos de ação não sejam completamente esclarecidos, muitos estudos *in vitro* têm demonstrado sua ação na inibição de várias funções biológicas de células envolvidas com mecanismos inflamatórios, incluindo a dos PMN (Clark *et al* 1979, Altman *et al* 1981, Schleimer 1990, Perreti & Flower 1993, Yamaguchi *et al* 1994). Quanto à locomoção em particular, a maioria dos estudos relata seus efeitos inibitórios sobre PMN quando induzidos por substâncias como IL-8, IL-3, C5a, fMLP ou LPS (Lomas *et al* 1991, Zentay *et al* 1999).

Neste estudo, seu potencial inibitório sobre a quimiotaxia de PMN induzida por caseína foi investigada, tratando-se previamente leucócitos humanos provenientes de indivíduos dos grupos I e II com diferentes concentrações (10^{-7} a 10^{-3} M) de DEXA (item 9) e submetendo-os ao ensaio de quimiotaxia, como previamente descrito.

Como apresentado na Figura 11, um efeito inibitório da DEXA pôde ser observado na migração de PMN de ambos os grupos, em todas as doses testadas, quando comparados às respectivas populações não tratadas (normalizadas em 100%). Para o grupo I, essa migração variou de $71,3 \pm 12,2\%$ à $64,3 \pm 11,0\%$, e para o grupo II, de $69,3 \pm 5,0\%$ à $74,0 \pm 6,24\%$, nas doses de 10^{-7} a 10^{-3}M , sendo significativa já na dose de 10^{-5}M , onde a migração das duas populações leucocitárias foi de aproximadamente 69% ($p \leq 0,05$).

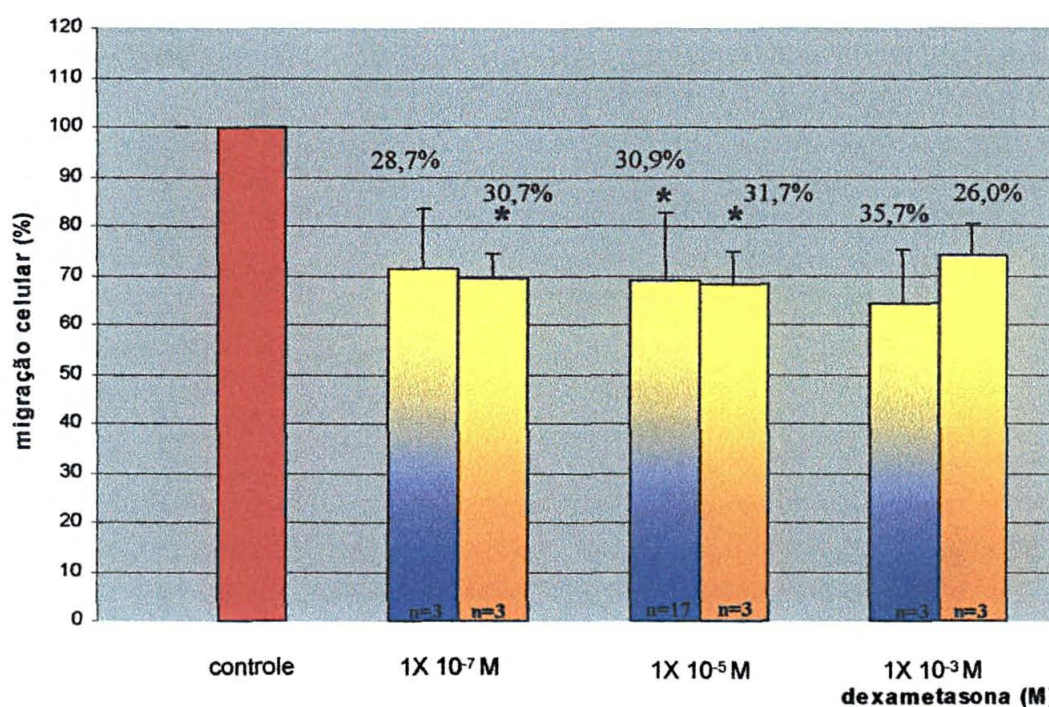


Figura 11. Migração leucocitária inibida por dexametasona. Leucócitos obtidos de doadores saudáveis e portadores de neutrofilia foram tratados por 30 minutos com concentrações indicadas de dexametasona e submetidos à migração em câmara de Boyden, por 90 minutos, contra um gradiente de 1% (p/v) de caseína. Cada coluna representa a média \pm 1 EPM da percentagem de células migradas em relação àquelas não-tratadas (normalizada em 100%), de experimentos independentes submetidos às mesmas condições ($n = 3$ a 17) (* $p \leq 0,05$ – Teste *t student*)

Nossos resultados demonstraram que a DEXA também foi capaz de inibir, *in vitro*, de forma significativa, a quimiotaxia de PMN induzida por caseína, como já descrito para outras substâncias quimioatraentes para PMN como a IL-8 (Yamaguchi *et al* 1994, Zentay *et al* 1999) e o fMLP (Lomas *et al* 1991). Essa inibição de cerca de 30% encontrada em nossos ensaios foi semelhante a descrita para basófilos quando estimulados por IL-3, IL-8 e C5a (Yamaguchi *et al* 1994).

Vale ressaltar que a inibição observada em nossos experimentos não foi resultante de um efeito citotóxico da DEXA sobre os leucócitos, pois em todos os ensaios, a viabilidade desses sempre se mostrou superior à 95%, avaliada com azul de tripano. Além disso, o efeito foi semelhante tanto para PMN provenientes de indivíduos saudáveis, como para aqueles oriundos de indivíduos portadores de quadro laboratorial com características de infecção.

Embora os mecanismos pelos quais a DEXA altera o recrutamento celular, particularmente de neutrófilos, tenham sido muito pouco explorados, alguns estudos têm demonstrado que a mesma parece interferir nos processos moleculares que regulam a síntese e a secreção de citocinas inflamatórias, particularmente a IL-8 (Cassatella *et al* 1992, Cassatella 1995, Zentay *et al* 1999).

Por exemplo, fibroblastos renais (De Haij, *et al* 2002) e pulmonares (Tobler, *et al* 1992), células epiteliais bronquiais primárias (Kwon *et al* 1994, Chang *et al* 2001, van Wetering *et al* 2002) e imortalizadas (Park *et al* 1999), células adiposas (Brunn *et al* 2001) e PMN (Irakam *et al* 2002), quando estimulados pela presença das citocinas inflamatórias TNF e IL-1, demonstraram aumento significativo tanto na expressão de RNAm de IL-8, detectado por *Northern-blot*, como na síntese de IL-8, confirmada por imunoensaios. O tratamento prévio dessas células com DEXA inibiu, de forma significativa, tanto a transcrição como a tradução de IL-8.

Dessa forma, é possível que a ação da DEXA relacionada à inibição da migração de PMN induzida por caseína possa estar envolvida, também, nos processos que controlam a geração de IL-8 por essas células, seja em nível transcricional ou pós-transcricional (Chang *et al* 2001), como sugerido para outros tipos celulares. Outra possibilidade seria uma ação similar da DEXA sobre outras

citocinas pró-inflamatórias (Barnes 1993, Scheinman *et al* 1995, Zentay *et al* 1999), como já descrito para IL-6 (Tobler *et al* 1992, van Wetering *et al* 2002) e GM-CSF (Tobler *et al* 1992).

O uso de anticorpos monoclonais neutralizantes da IL-8 ou de drogas bloqueadoras de transcrição ou de síntese protéica, como a actinomicina e a ciclohexamida, respectivamente, poderiam contribuir no esclarecimento desses mecanismos.

Extrato de plantas

Abordagem fitoquímica

Tendo o ensaio de migração sido validado para as condições experimentais testadas e observado que a DEXA poderia ser usada como um controle positivo de inibição leucocitária induzida por caseína, prosseguiu-se com o preparo dos extratos hidroalcóolicos, conforme descrito no item 10, de duas amostras de camomila, pau-pra-tudo, canela de veado e cipó-suma a serem utilizados na avaliação da sua atividade sobre a locomoção de PMN humanos.

Em seguida, procedeu-se abordagem fitoquímica clássica para identificação dos grupos químicos presentes em cada um dos extratos preparados (Matos 1988). As reações que mostraram a presença do grupo químico investigado foram referidas como positivas, relatadas de forma quantitativa subjetiva, em cruces, dependendo da quantidade de cromóforos gerados e/ou precipitado formado, variando de fraca ou pouco intensa (+) à moderada (++) ou forte (+++).

A Tabela 5 resume todos os ensaios realizados, assim como os resultados obtidos.

Tabela 5. Abordagem fitoquímica do extrato bruto de (1) *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert ou camomila; (2) *Rauvolfia sellowiana* (Cham&Schul) ou pau-pra-tudo; (3) *Hybanthus bigibbosus* (St.-Hil.) Hassler ou canela-de-veado; (4) *Anchieta pyrifolia* (Mart.) G. Don. ou cipó-suma.

GRUPO QUÍMICO	REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO	PLANTAS			
		1	2	3	4
		N I			
FLAVONÓIDES	Shinoda	++	–	–	–
	Cloreto de alumínio	++	–	–	–
ALCALÓIDES	Bertrand	–	–	–	–
	Mayer	–	+++	+	–
	Dragendorff	–	+++	+	–
	Bouchardat	–	–	–	–
SAPONINAS	Formação de espuma	–	++	+++	+
TANINOS	Gelatina 2%	+	–	–	–
	Cloridrato de quinina 10%	+	–	–	–
	Acetato de chumbo	+	–	–	–
	Acetato de cobre	+	–	–	–
	Cloreto férrico 2%	+	–	–	–
GLICOSÍDEOS CARDIOTÔNICOS	Reação de Pezes				
	Reação de Keller-Killiani	–	–	–	–
ANTRAQUINONAS	Reação de Bornträger	–	–	–	–

(–): ausência de reação; (+): reação fraca; (++) : reação moderada; (+++): reação forte.

N: camomila nacional

I: camomila egípcia

A presença de quantidade moderada de flavonóides, assim como a de taninos foi registrada somente no extrato hidroalcolico da camomila. Reação forte para alcalóides foi observada para o extrato de pau-pra-tudo, em contraste com modesta presença detectada no extrato hidroalcolico de canela-de-veado. Por outro lado, saponinas mostraram-se presentes em quantidades variáveis nos extratos de pau-pra-tudo, canela-de-veado e cipó-suma. Glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas não foram detectados em nenhuma das amostras testadas.

Em contraste com a ausência de informações sobre a composição química das outras três plantas testadas, a presença de flavonóides e taninos detectados no extrato hidroalcólico de camomila estão de conformidade com a literatura (Salamon 1992, Newall *et al* 1996).

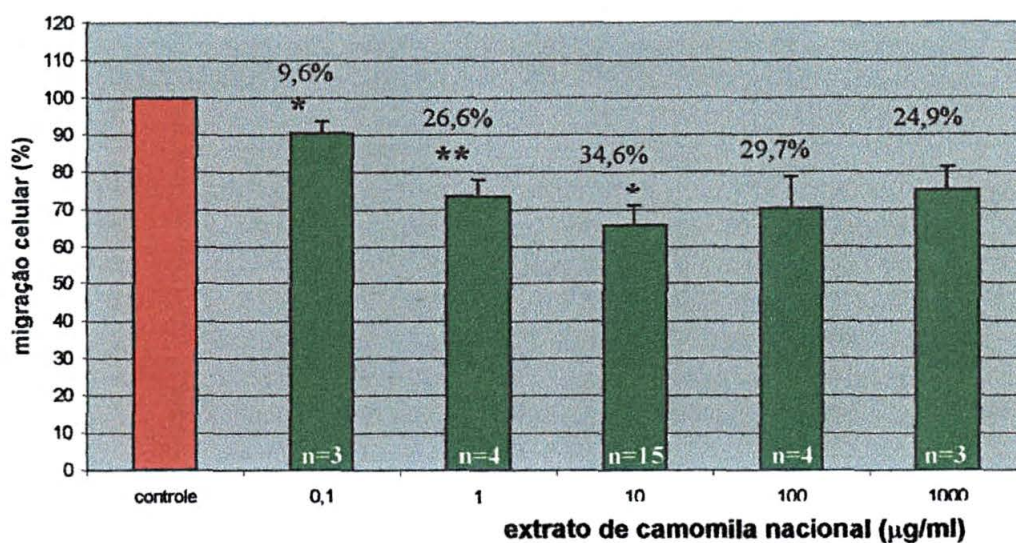
Influência dos extratos de plantas na quimiotaxia leucocitária

O ensaio de quimiotaxia proposto por Boyden (Boyden 1962) e suas variações têm se mostrado úteis como metodologia para investigar o efeito de substâncias extraídas de plantas sobre a quimiotaxia de leucócitos (Muller *et al* 1999, Hofbauer *et al* 2000, Chen *et al* 2001, Hofbauer *et al* 2001, Shen *et al* 2001).

Usando um sistema similar, investigou-se o comportamento de leucócitos humanos obtidos de indivíduos sadios na quimiotaxia induzida por caseína quando previamente tratados, por 30 minutos a 37°C, com concentrações de 0,1 a 1000 µg/ml dos extratos hidroalcólicos das camomilas nacional e importada, do pau-pra-tudo, cipó-suma e da canela-de-veado, cujos resultados estão apresentados nas figuras 12, 13, 14, 15, respectivamente, onde cada coluna representa, na dose indicada, a percentagem de células recuperadas no compartimento inferior das câmaras em relação à população controle, não tratada, normalizada em 100%. Deve-se ressaltar, porém, que nenhum dos extratos apresentou atividade citotóxica para as populações celulares nas doses testadas, avaliada com azul de tripano (item 4).

A exposição de leucócitos humanos a diferentes concentrações do extrato hidroalcólico da camomila nacional resultou numa inibição dose-dependente direta da migração de PMN até a dose de 10 µg/ml. Na concentração de 0,1 µg/ml, $90,4 \pm 3,2\%$ ($n = 4$) das células migraram para o compartimento inferior da câmara e esse valor diminuiu para $73,4 \pm 4,5\%$ ($n = 4$; $p \leq 0,01$) e $65,4 \pm 6,2\%$ ($n = 15$; $p \leq 0,05$) nas concentrações de 1 e 10 µg/ml, respectivamente (Figura 12/A), sendo estatisticamente significativos quando comparados à população não tratada.

A



B

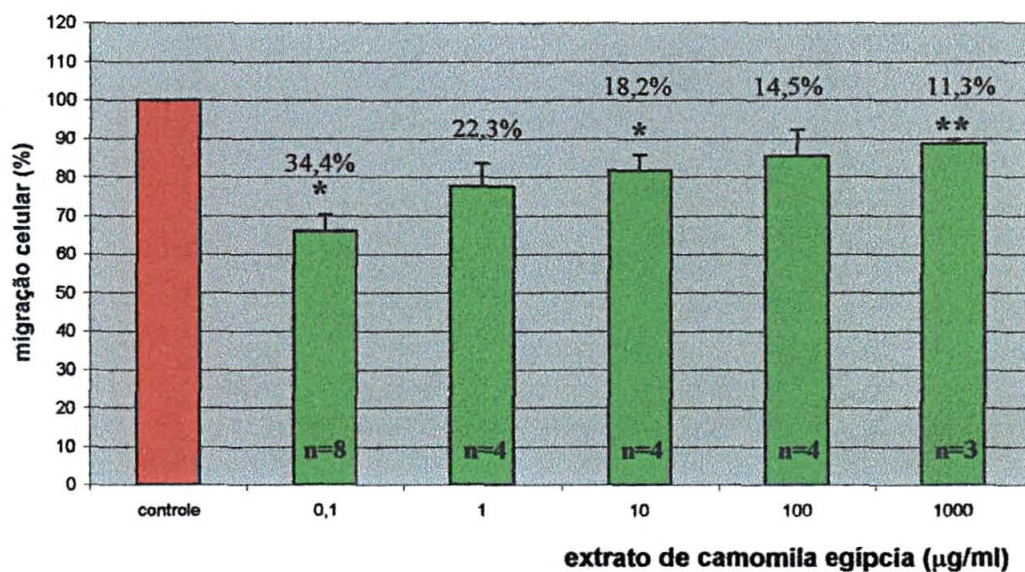


Figura 13. Efeito do extrato hidroalcoólico de camomila sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores sadios foram incubados por 30 minutos a 37°C, com o extrato hidroalcoólico de camomila nacional (A) e camomila egípcia (B) e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 1% (p/v) por 90 minutos a 37°C, em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média \pm 1 EPM da percentagem de células migradas em relação àquelas não-tratadas (normalizada em 100%), de experimentos independentes submetidos às mesmas condições (n = 3 a 15 * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ Teste *t student*).

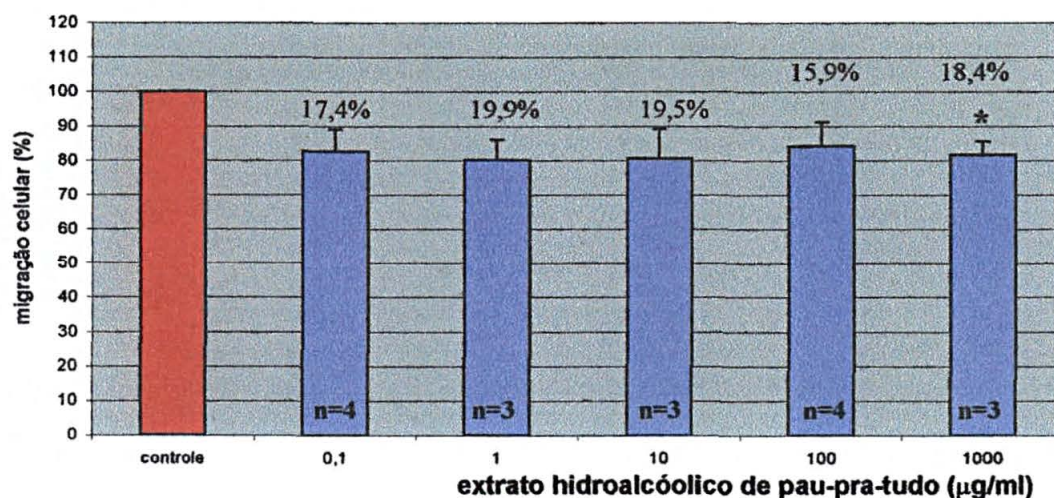


Figura 13. Efeito do extrato hidroalcolólico de pau-prá-tudo sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores sadios foram incubados por 30 minutos a 37°C, com o extrato hidroalcolólico de pau-prá-tudo e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 1% (p/v) por 90 minutos a 37°C, em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média \pm 1 EPM da percentagem de células migradas em relação àquelas não-tratadas (normalizada em 100%), de experimentos independentes submetidos às mesmas condições (n = 3 a 4; * $p \leq 0,05$ Teste *t student*)

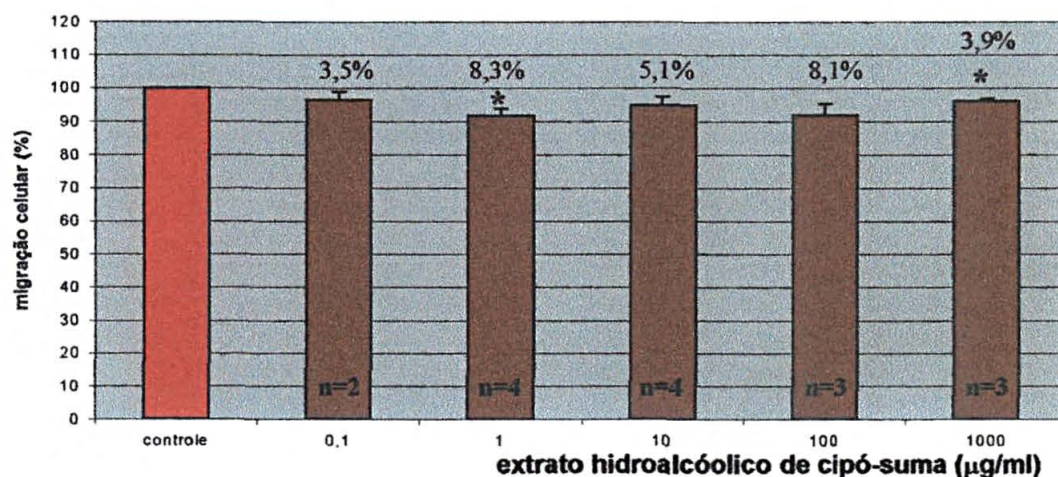


Figura 14. Efeito do extrato hidroalcolólico de cipó-suma sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores sadios foram incubados por 30 minutos a 37°C, com o extrato hidroalcolólico de cipó-suma e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 1% (p/v) por 90 minutos a 37°C, em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média \pm 1 EPM da percentagem de células migradas em relação àquelas não-tratadas (normalizada a 100%), de experimentos independentes submetidos às mesmas concentrações (n = 2 a 4; * $p \leq 0,05$ – Teste *t student*).

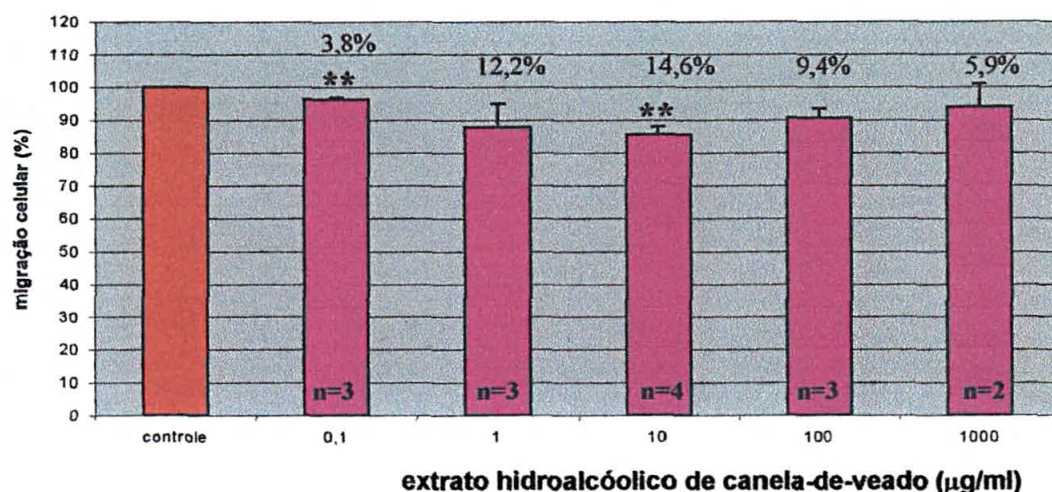


Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico de canela-de-veado sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores sadios foram incubados por 30 minutos a 37°C, com o extrato hidroalcoólico de canela-de-veado e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 1% (p/v) por 90 minutos a 37°C, em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média \pm 1 EPM da percentagem de células migradas em relação àquelas não-tratadas (normalizada a 100%), de experimentos independentes submetidos às mesmas concentrações (n = 2 a 4; * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ – Teste *t* student).

Por outro lado, quando tratamento semelhante foi realizado com a camomila de origem egípcia, observou-se um efeito inibitório significativo dose-dependente inverso, ou seja, na menor concentração de extrato utilizada (0,1 µg/ml) obteve-se máximo efeito inibitório, com somente $65,96 \pm 4,33\%$ (n = 8; $p \leq 0,05$) das células recuperadas no compartimento inferior da câmara. Este efeito declinou gradativamente até que, na concentração de 1000 µg/ml, a dose mais elevada testada, observou-se que $88,7 \pm 1,1\%$ (n = 3; $p \leq 0,01$) dos PMN haviam migrado (Figura 12/B).

Nossos estudos permitiram observar que os extratos de camomila testados mostraram-se significativamente eficientes na inibição da quimiotaxia de PMN induzida por caseína. Porém, a máxima intensidade desse efeito foi distintamente maior para o espécime importado em proporção à dose utilizada, provavelmente devido a diferenças no teor de constituintes entre elas. Ou seja, o efeito inibitório de ~35% observado para a concentração de 10 µg/ml da camomila

crescida em solo nacional foi semelhante ao observado na concentração de 0,1µg/ml da camomila egípcia.

Outro aspecto interessante deste estudo relaciona-se à curva dose-resposta de inibição obtida para os dois extratos. Enquanto doses crescentes do extrato hidroalcolico do espécime nacional levaram a um perfil em forma de sino invertido, o da importada foi inversamente proporcional à dose testada. É provável que o uso de concentrações menores do produto importado possa mostrar um perfil similar ao observado com o nacional.

Assim, o aspecto em forma de sino invertido obtido com a amostra nacional, sugere, primeiro, que componentes presentes no extrato interagem com receptores comuns à caseína, pois bloqueiam, proporcionalmente à dose usada, a quimiotaxia de PMN por ela induzida. Deve-se ressaltar que os leucócitos foram pré-tratados com os extratos hidroalcolicos das plantas por 30 minutos, ao qual seguiu-se lavagem exaustiva para retirada do excesso do mesmo, antes de serem submetidos ao ensaio de locomoção. Dessa forma, não houve, durante o período de indução de quimiotaxia, competição entre a caseína e os componentes do extrato por receptores presentes nos leucócitos, uma vez que estes já encontravam-se ocupados pela camomila, quando expostos à caseína.

Segundo, os compostos presentes no extrato de camomila parecem atuar também em outros receptores, pois seu efeito antagonista não foi total. Além disso, nas concentrações mais elevadas testadas (>10µg/ml), observou-se uma diminuição proporcional deste efeito, sugerindo um efeito dessensibilizador de receptor. Ensaio de competição entre a caseína e o extrato de camomila por receptores presentes nos PMN poderiam, com certeza, colaborar para esclarecer o comportamento inibitório observado.

Ao estudar-se o efeito do extrato hidroalcolico do pau-pra-tudo em ensaios semelhantes aos realizados para a camomila, atividade inibitória também foi observada quando comparada às células não tratadas (Figura 13). Porém, esta atividade manteve-se muito próxima dos 20% em todas as concentrações utilizadas, sendo significativa somente na concentração de 1000µg/ml, quando

81,6 ± 3,9% das células tratadas foram recuperadas no compartimento inferior da câmara (n = 3; p ≤ 0,05).

Quanto ao extrato hidroalcólico de cipó-suma, efeito inibitório bastante semelhante em todas as doses testadas também foi observado (Figura 14), sendo somente as concentrações de 1 e 1000µg/ml estatisticamente significativas, com 91,7 ± 2,2% (n = 4, p ≤ 0,05) e 96,1 ± 0,7% (n = 3, p ≤ 0,05) das células recuperadas após migração. Porém, esse efeito inibitório (± 10%) não é, farmacologicamente, considerado representativo.

Embora com efeitos similares, os extratos de pau-pra-tudo e cipó-suma mostraram intensidades bastante particulares, sendo aquele pelo menos três vezes mais potente na inibição da locomoção leucocitária do que este.

Já o tratamento prévio de leucócitos com o extrato hidroalcólico de canela-de-veado mostrou uma *performance* semelhante à observada para a camomila nacional, porém com intensidade inferior (Figura 15). Embora baixas concentrações tenham sido suficientes para inibir de forma significativa a migração de PMN induzida por caseína, máximo efeito ocorreu na dose de 10µg/ml, quando 85,4 ± 2,4% (n = 4; p ≤ 0,01) dos PMN foram recuperados após migração.

Os resultados aqui apresentados mostraram que os extratos hidroalcólicos de camomila, pau-pra-tudo, e canela-de-veado possuem a habilidade de interferir na quimiotaxia de PMN, investigada num sistema *in vitro*, específico para avaliar esta função. Portanto, é possível que a atividade antiinflamatória atribuída a essas plantas na medicina caseira, possa estar relacionada à sua capacidade de alterar os mecanismos que envolvem o recrutamento de células envolvidas na resposta inflamatória.

Efeitos inibitórios de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de PMN como os aqui apresentados têm sido descritos para extratos de outras plantas. Por exemplo, o extrato das folhas de *Phyllanthus emblica* L. reduziu cerca de 95% a quimiotaxia de PMN humanos induzida por LTB₄ e fMLP (Inhantola-Vormisto *et al* 1997), enquanto 25% de inibição foi verificado para o extrato de *Allium sativum* (Hofbauer *et al* 2001). Extrato de chá verde em várias concentrações também

mostrou-se eficiente em inibir a quimiotaxia de PMN através de uma monocamada de células endoteliais (Hofbauer *et al* 1999).

Por outro lado, a quimiotaxia constitui uma das etapas de um universo de processos que regulam e medeiam sincronicamente as respostas imune e inflamatória. Como esses processos são interdependentes, o efeito antiinflamatório dos extratos de plantas poderia estar relacionado também a um efeito simultâneo interativo de inibição de enzimas pró-inflamatórias, diminuição ou eliminação de radicais livres ou efeitos semelhantes aos causados por corticóides, dentre outros como proposto por Schinella e colaboradores (Schinella *et al* 2002), os quais interfeririam no recrutamento de PMN ao sítio inflamatório, aliviando ou até mesmo erradicando os sintomas característicos da reação inflamatória.

Portanto, apesar de que os extratos testados no presente trabalho terem apresentado resultados sugestivos de sua participação na quimiotaxia, não se pode excluir a possibilidade do envolvimento dessas plantas em outros mecanismos intracelulares participantes da resposta inflamatória. Estudos mais aprofundados desses efeitos poderão ser realizados por meio de ensaios experimentais específicos, que investiguem os mecanismos celulares em nível molecular.

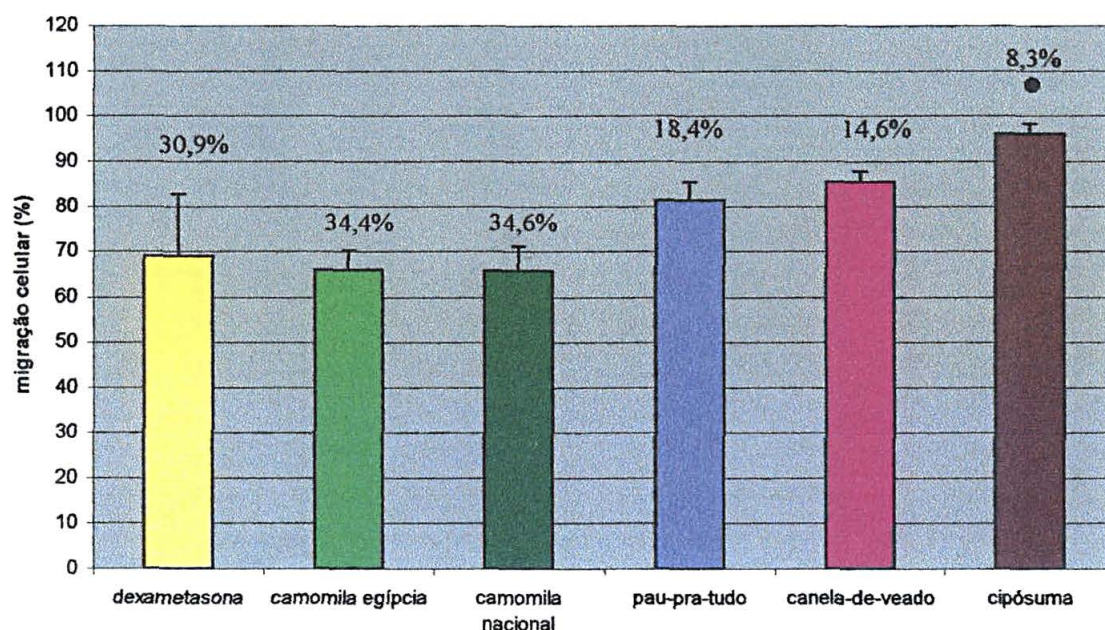
Efeito inibitório da dexametasona e dos extratos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos

Como demonstrado na seção anterior, os resultados obtidos de atividade migratória com os diferentes extratos estudados revelaram distintos graus de efeito. Com o objetivo de classificar as diferentes plantas em termos de eficácia, comparou-se primeiramente a eficiência dos extratos na sua concentração efetiva máxima encontrada com a DEXA (10^{-5}M), usada como referencial de modulação negativa nos ensaios de migração (Lomas *et al* 1991). Num segundo momento, comparou-se as plantas testadas entre si e em relação ao controle (células não-tratadas).

Como demonstrado na Figura 16, os extratos de camomila nacional e importada apresentaram inibição máxima próxima de 34% na quimiotaxia mediada por caseína *in vitro*. Para a camomila egípcia, seu efeito foi semelhante ao demonstrado pela DEXA (~30%) nas concentrações de 0,1 a 100 µg/ml ($p \leq 0,1$), com melhor inibição na dose de 0,1µg/ml. Para a camomila nacional, o melhor efeito foi obtido na concentração de 10µg/ml. Também apresentaram inibição estatisticamente significativas em relação a DEXA ($p > 0,1$), os extratos de pau-pra-tudo nas concentrações de 0,1, 10 e 1000µg/ml, e de canela-de-veado, nas concentrações de 0,1 e 10µg/ml, sendo máximos nas concentrações de 1000µg/ml (~20%) e de 10µg/ml (~14%), respectivamente.

Em contraste, o extrato de cipó-suma não demonstrou, em nenhuma das doses testadas, eficiência nesta atividade que pudesse ser comparada à DEXA, com valores baixos de inibição da quimiotaxia (~8%).

Estes estudos não nos permitiram classificar os extratos de plantas testados em grupos distintos com relação à eficiência de seu efeito inibitório sobre a quimiotaxia de PMN humanos estimulados por caseína, quando comparados entre si. Porém, foi possível delinear um perfil de ação para essas drogas vegetais como o apresentado na Tabela 6: enquanto os extratos de camomila nacional e egípcia, por terem demonstrado maior atividade, comporiam um primeiro grupo (Grupo 1), o extrato de pau-pra-tudo, por ter demonstrado resultados significativos, mas menos expressivos que os das camomilas, ocuparia uma posição intermediária entre os Grupos 1 e 2. Da mesma forma, o extrato de canela-de-veado, com efeitos de moderado a fraco, faria parte do segundo grupo (Grupo 2) e de um terceiro grupo, junto com o extrato de cipó-suma, que apresentou atividade porém não-significativa nos ensaios realizados (Grupo 3).



extratos µg/ml	M					
0,1	10 ⁻⁵	=	≠	=	≠	≠
1	10 ⁻⁵	=	=	≠	=	≠
10	10 ⁻⁵	=	=	=	=	≠
100	10 ⁻⁵	=	=	=	≠	≠
1000	10 ⁻⁵	≠	=	≠	≠	≠

Figura 16. Comparação da eficiência da dexametasona e dos extratos aquosos de plantas medicinais sobre a inibição da quimiotaxia de leucócitos humanos. Leucócitos obtidos de doadores sadios pré-tratados com dexametasona (10^{-5} M) □, extrato hidroalcoólico de camomila egípcia (0,1 µg/ml) ■, camomila nacional (10 µg/ml) ■, pau-pra-tudo (1 µg/ml) ■, canela-de-veado (10 µg/ml) ■ e cipó-suma (1 µg/ml) ■ foram submetidos à migração induzida por caseína a 1% (p/v) em câmara de Boyden, por 90 minutos, a 37°C. As colunas representam a porcentagem de PMN migrados na concentração mais eficiente, recuperados no compartimento inferior em relação à população não-tratada, normalizada em 100% (n = 3; • p ≤ 0,1 – Teste t). A tabela mostra as concentrações dos extratos hidroalcoólicos das plantas estudadas que foram semelhantes (=) ao efeito inibitório demonstrado pela Dexametasona, nas condições experimentais testadas.

Tabela 6. Comparação do efeito sobre a quimiotaxia leucocitária induzida por caseína entre os extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais, quando comparados com células não-tratadas.

PLANTAS (extrato hidroalcoólico)	n	GRUPOS		
		1	2	3
Camomila nacional	30	X		
Camomila egípcia	23	X		
Pau-pra-tudo	17	X	X	
Canela-de-veado	15		X	X
Cipó-suma	16			X

(análise de comparações múltiplas, ANOVA – LSD, para 95% de confiança).

Uma justificativa possível para o melhor efeito do extrato de camomila em relação às outras plantas estudadas, pode estar no fato de que nenhuma delas apresenta grupos de constituintes químicos semelhantes à camomila (Tabela 5), capaz de alterar a migração de leucócitos ao foco inflamatório em testes *in vivo*, a exemplo dos flavonóides (Mascolo *et al* 1988), taninos (Mota *et al* 1985) ou constituintes aromáticos (Isaac 1979, Jakolev & Isaac 1979, Jakolev *et al* 1983). Os extratos de pau-pra-tudo e a canela-de-veado apresentam alcalóides e saponinas que também podem estar envolvidos no efeito biológico encontrado. No extrato de pau-pra-tudo, por exemplo, a presença significativa de alcalóides indólicos (Batista *et al* 1995), pode ser o grupamento químico potencialmente envolvido no efeito inibitório apresentado por essa planta.

Apesar de todas as plantas testadas possuírem indicação popular relacionada a alguma atividade antiinflamatória, a ausência de um grupo químico semelhante entre elas não nos forneceu indícios de que uma única classe de constituintes pudesse ser a responsável pela inibição quimiotática destas plantas.

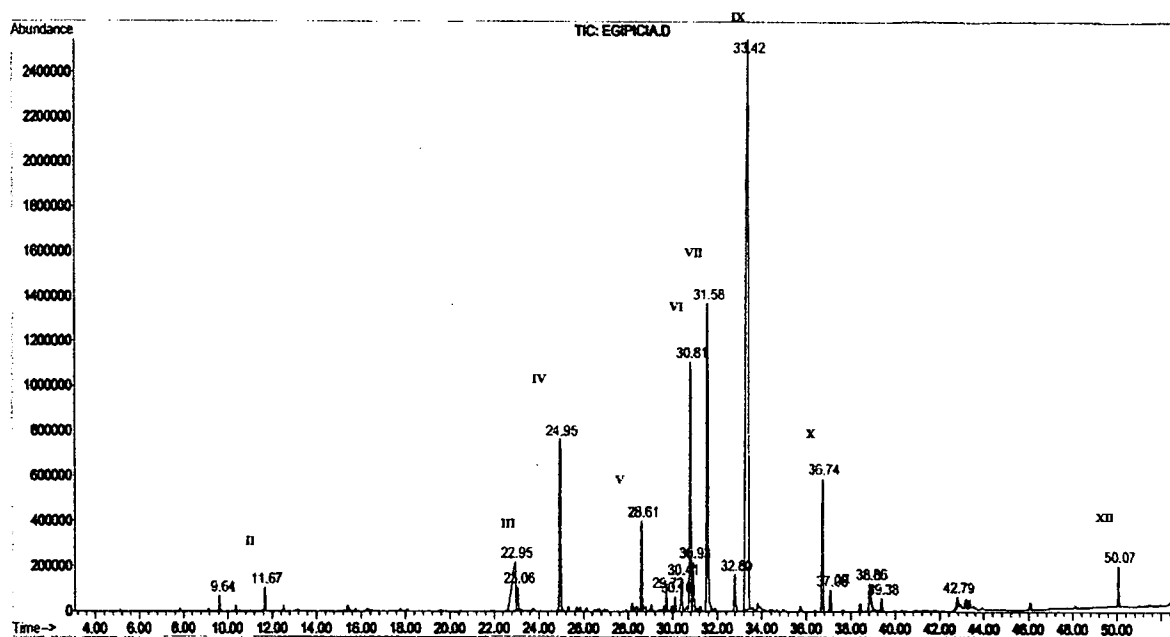
Entretanto, a análise de substâncias puras isoladas dos extratos dessas plantas constituiria, então, uma fonte importante de investigação na tentativa de se obter respostas ainda mais claras. Porém, é possível que a mistura dessas várias substâncias possa ser também, mais efetiva que constituintes específicos isolados (Santana-Rios *et al* 2001, Sarkar & Bhanduri 2001, Hernández-Ceruelos *et al* 2002).

Devido o maior efeito das amostras de camomila (nacional e egípcia), as quais apresentaram o mesmo valor de inibição porém, em concentrações diferentes, decidiu-se pesquisar possíveis diferenças quantitativas e/ou qualitativas nos constituintes desses extratos que pudessem justificar a eficácia dessa droga vegetal no ensaio de quimiotaxia proposto.

Sendo a camomila uma droga aromática, procedeu-se a extração dos óleos voláteis, por hidrodestilação com posterior análise em CG-EM, tanto do espécime nacional quanto do importado. Os teores de óleo essencial encontrados foram de 0,5% (p/v) para a importada e 0,3% (p/v) para a amostra nacional. A literatura refere que o teor de óleo essencial nos capítulos florais de camomila varia de 0,5 a 1,5% (Salamon 1992, Siani *et al* 1999, Siani *et al* 2000) enquanto que o teor mínimo na Farmacopéia Brasileira 4ª Edição é de 0,4% (Farmacopéia 1996). Dessa forma, a amostra de camomila nacional já não está dentro do padrão exigido para a droga.

O resultado da análise das amostras em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) apresentou, para a camomila egípcia, um perfil cromatográfico semelhante ao descrito na literatura (Jakolev & Isaac 1979, Scalia *et al* 1999), enquanto que a camomila nacional apresentou um perfil diferente (Figura 17).

A



B

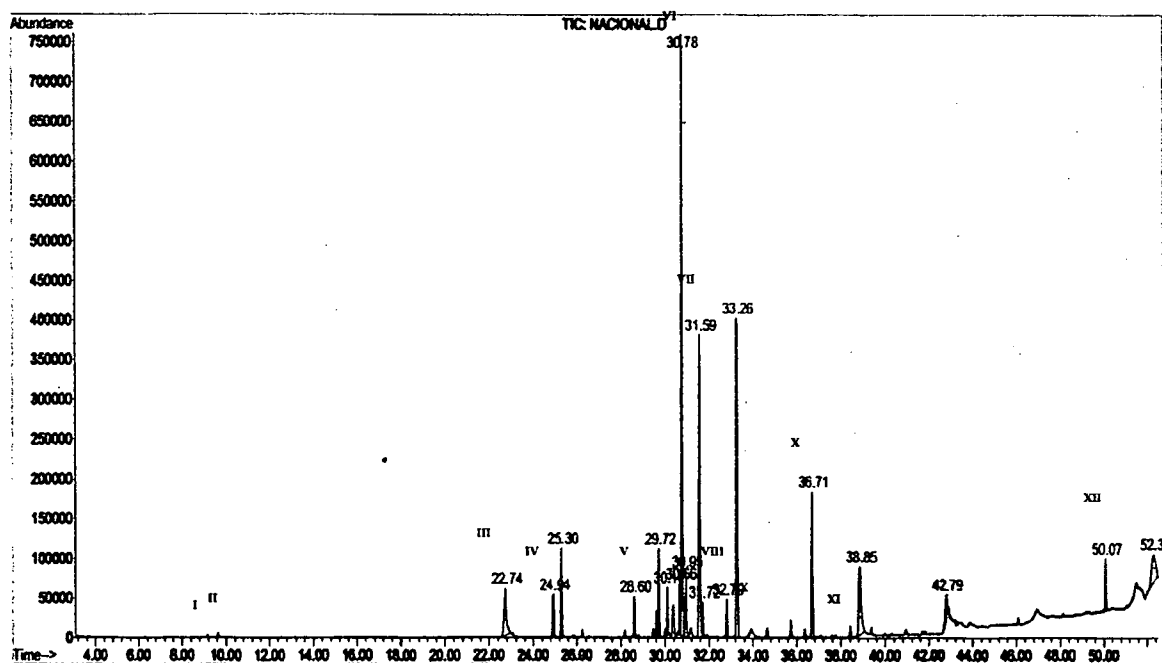


Figura 17. Cromatogramas CG-EM do óleo essencial de capítulos florais de camomila obtidos por hidrodestilação em Aparelho de Clevenger. Óleo essencial de camomila egípcia (A), Óleo essencial de camomila nacional (B)

Os constituintes de cada óleo foram identificados através de comparação dos tempos de retenção com dados da literatura e análise da fragmentação dos compostos e intensidade dos picos nos espectros de massa. Como exemplo, a artemísia cetona (II) $C_{10}H_{16}O$, $[M^+ 152]$ apresentou no seu espectro de massa (Figura 18) fragmentos importantes em m/z 83 (100%) e m/z 69 devido à ruptura entre C-3 e C-4. Uma outra fragmentação do composto pode acontecer entre C-5 e C-6 formando o íon m/z 55 (30%) do radical isobutenila e m/z 97. Ambos fragmentos em m/z 97 menos o fragmento em m/z 69, como também se subtrairmos o valor de m/z 83 menos m/z 55, fornecem um valor correspondente a uma carbonila (M 28), o que sugere a estrutura de 3,3,6-trimetil-1,5-heptadien-4-ona (II).

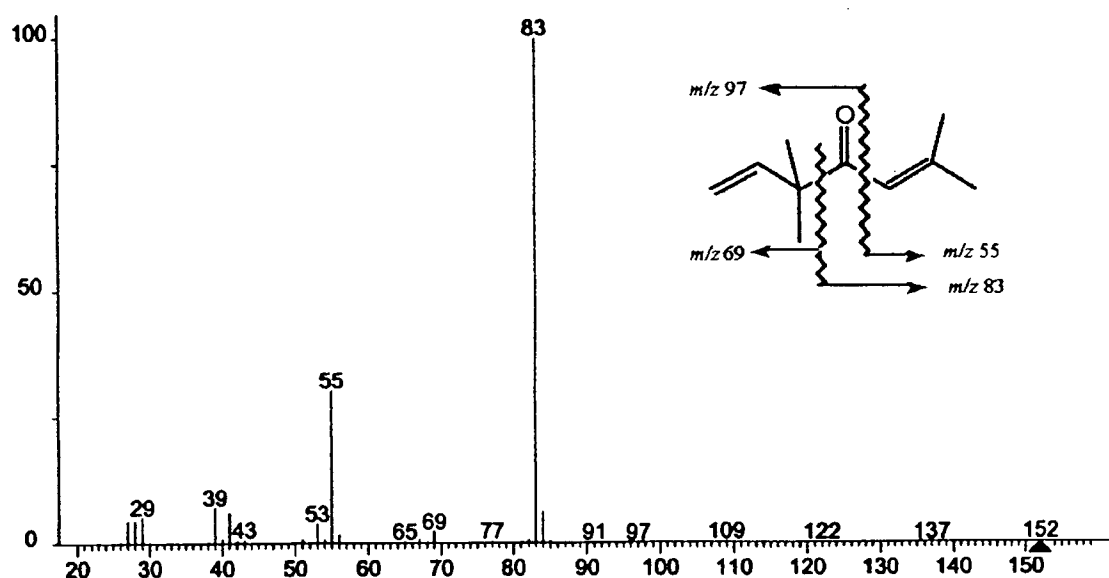


Figura 18 – Espectro de massa de artemísia cetona (II)

Dessa forma foi possível identificar os principais constituintes do óleo essencial de ambas amostras, conforme sumariado na Tabela 7 .

Tabela 7. Constituintes dos óleos essenciais de amostras de camomila nacional e importada obtidos por hidrodestilação e analisados por CG-EM, comparados com a literatura.

Tempo de retenção	Composto	Comparação das % de abundância relativa ¹					Referências
		Nacional	Egípcia	Lit. ²	Lit. ³	Lit. ⁴	
9,64	Não identificado	< 0,1	0,41	-	-	-	-
10,35	<i>p</i> -Cimeno (I)	-	0,13	-	-	-	1
11,67	Artemisia cetona (II)	-	0,63	-	-	-	1
22,74	Ácido <i>n</i> -decanóico (III)	4,47	5,23	-	-	-	1
23,06	Éster etílico do ácido <i>n</i> -decanóico	-	0,84	-	-	-	1
24,95	α -Farneseno (IV)	1,54	5,55	12,8	-	28,17	1, 2 e 4
25,30	Não identificado	3,21	-	-	-	-	-
28,60	Espatulenol (V)	1,62	3,03	2,6	-	-	1 e 2
30,10	Não identificado	1,81	0,53	-	-	-	-
30,66	β -Eudesmol (?)	2,22	1,38	9,2 ⁵	-	-	1 e 2
30,81	Óxido B do α -Bisabolol (VI)	30,78	9,78	7,8	5,0 – 7,8	4,35	1, 2, 3 e 4
30,93	Não identificado	3,33	1,96	-	-	-	-
31,59	α -Bisabolol (VII)	16,42	12,29	3,6	0,9 – 2,2	2,31	1, 2, 3 e 4
31,72	Não identificado	1,53	-	-	-	-	-
32,79	Chamazuleno (VIII)	1,47	1,42	< 0,5	-	2,39	1, 2 e 4
33,42	Óxido A do α -Bisabolol (IX)	13,60	46,55	36,6	32,7 – 37,8	41,77	1, 2, 3 e 4
36,74	<i>cis</i> -en-in-dicicloéter (X)	5,82	5,07	2,7	-	-	1 e 2
37,08	<i>trans</i> - en-in-dicicloéter	-	0,67	-	-	-	1 e 2
38,42	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico (XI)	5,63	1,85	cera	-	-	1
38,85	Não identificado	-	-	-	-	-	-
39,38	Éster etílico do ácido <i>n</i> -hexadecanóico	< 0,1	0,41	cera	-	-	1
42,79	Não identificado	1,40	0,41	-	-	-	-
50,07	Hexatriacontano (XII)	2,20	1,34	cera	-	0,50	1 e 4

¹ Baseado na porcentagem de área de cada pico, em apenas uma determinação

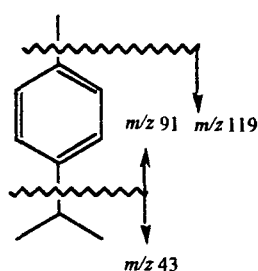
² Dados obtidos de Scalia et. al, 1999.

³ Dados obtidos de Jacovlev, 1979.

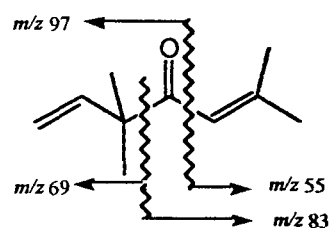
⁴ Dados obtidos de Hemadez-Ceruelos et al, 2002.

⁵ Não identificado na literatura consultada (Scalia et. al., 1999).

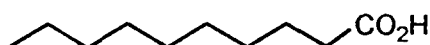
Ressalta-se que não foram encontradas na literatura referências com relação à presença de *p*-cimeno (I), artemísia cetona (II), ácido decanóico (III), identificados principalmente na amostra importada. Com relação aos compostos ácido *n*-hexadecanóico (XI) e seu éster etílico e o hexatriacotano (XII), a literatura apenas cita-os como “cêra”, enquanto que pelo peso molecular e pela análise dos fragmentos no espectro de massa foi possível identificar a presença desses hidrocarbonetos na amostra analisada.



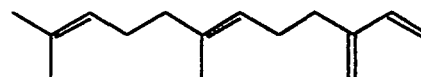
I
 $C_{14}H_{14}$ - PM 134



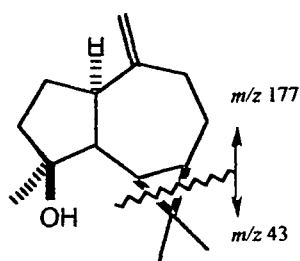
II
 $C_{10}H_{16}O$ - PM 152



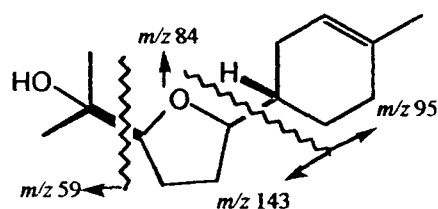
III
 $C_{10}H_{20}O_2$ - PM 172



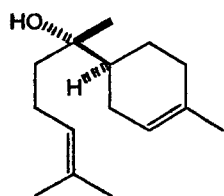
IV
 $C_{15}H_{24}$ - PM 204



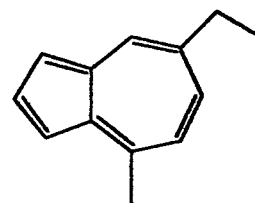
V
 $C_{10}H_{24}O$ - PM 220



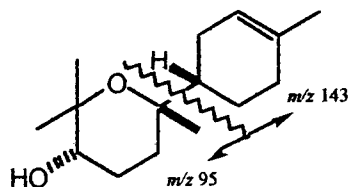
VI
 $C_{15}H_{26}O_2$ - PM 238



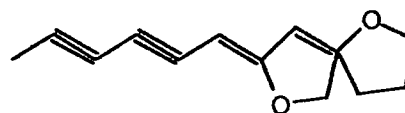
VII
C₁₅H₂₆O - PM 222



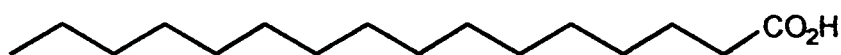
VIII
C₁₄H₁₆ - PM 184



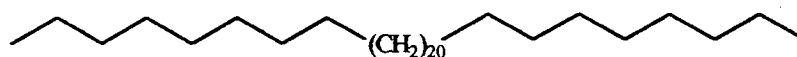
IX
(C₁₅H₂₆O₂ - PM 238)



X
C₁₃H₁₁O₂ - PM 200



XI
C₁₆H₃₂O₂ - PM 256



XII
C₃₆H₇₄ - PM 506

Os resultados obtidos revelaram que a maioria dos constituintes em ambos espécimes estão presentes em quantidades aproximadamente semelhantes, em concordância com dados citados na literatura (Hernández-Ceruelos, *et al* 2002, Jakolev & Isaac 1979, Jakolev, *et al* 1983, Scalia, *et al* 1999) como o camazuleno 1,47% e 1,42% para a nacional e importada, respectivamente. Outros constituintes importantes como o α -bisabolol, foram encontrados nas duas amostras em quantidades muito superiores ao citado na literatura. No entanto, a maior diferença entre as amostras nacional e importada foi

a inversão na porcentagem de abundância relativa dos derivados do α -bisabolol. Enquanto a literatura cita, para o óxido A do α -bisabolol, um teor de 36%, a amostra importada apresentou um teor de 46,6%. Para a amostra nacional, encontrou-se 13,60%. Ao contrário, para o óxido B do α -bisabolol, os valores da literatura são de 4,35 a 7,8, tendo a amostra importada um valor de 9,78%, enquanto que, na amostra nacional, o teor encontrado foi de 30,8%.

Essa variação nos teores dos constituintes do óleo essencial não deve justificar a diferença na atividade das amostras, pois sabe-se que o α -bisabolol é citado como um dos responsáveis pela ação antiinflamatória da droga (Jakolev & Isaac 1979, Ammon *et al* 1996,) enquanto que seus derivados oxidados são praticamente inativos (Jakolev *et al* 1983).

Não foi possível neste trabalho uma comparação por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) dos teores de flavonóides nos extratos das amostras utilizadas para avaliar se a apigenina ou derivados pudessem apresentar alguma interferência nos resultados encontrados.

Contribuição ao estudo do mecanismo de ação do extrato hidroalcoólico de camomila sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos

Os resultados de nossos estudos descritos acima indicaram que, embora com intensidade variável, todos os extratos hidroalcoólicos das plantas investigadas apresentaram atividade inibitória sobre a quimiotaxia de PMN humanos induzida pela caseína. Dentre eles, os extratos de camomila mostraram efeito surpreendentemente elevado, até mesmo maiores que aquele demonstrado pela droga padrão DEXA, nas condições experimentais usadas.

Porém, este efeito foi sobre a quimiotaxia especificamente estimulada pela caseína, um peptídeo que interage com receptores opióides, presentes na superfície de PMN (Lewis & Van Epps 1983, Makman *et al* 1995), como revisto na introdução desta dissertação. Esta associação nos levou, então, a formular a hipótese de que o efeito biológico dos extratos de camomila sobre a quimiotaxia

poderia estar, de alguma forma, relacionado a uma interação com receptores opióides.

O pré-tratamento de células-alvo com agonistas ou antagonistas têm sido usado como uma das metodologias para se evidenciar a influência de um dado receptor em mediar um efeito (Baggiolini & Moser 1997). Neste contexto, decidi-se investigar o efeito de dois compostos opióides sobre o comportamento migratório de leucócitos humanos no sistema experimental. Optou-se, então, pela morfina e pela naloxona, as quais medeiam seus efeitos atuando sobre receptores μ , δ e κ (Carr *et al* 1988, Carr *et al* 1989, Makman *et al* 1995).

Os efeitos do tratamento prévio de leucócitos humanos obtidos de indivíduos do grupo I, por 10 minutos a 37°C, com morfina e naloxona (10^{-7} M), isolados ou em combinação, antes de serem submetidos à migração contra um gradiente de 1% de caseína, estão apresentados na Figura 19.

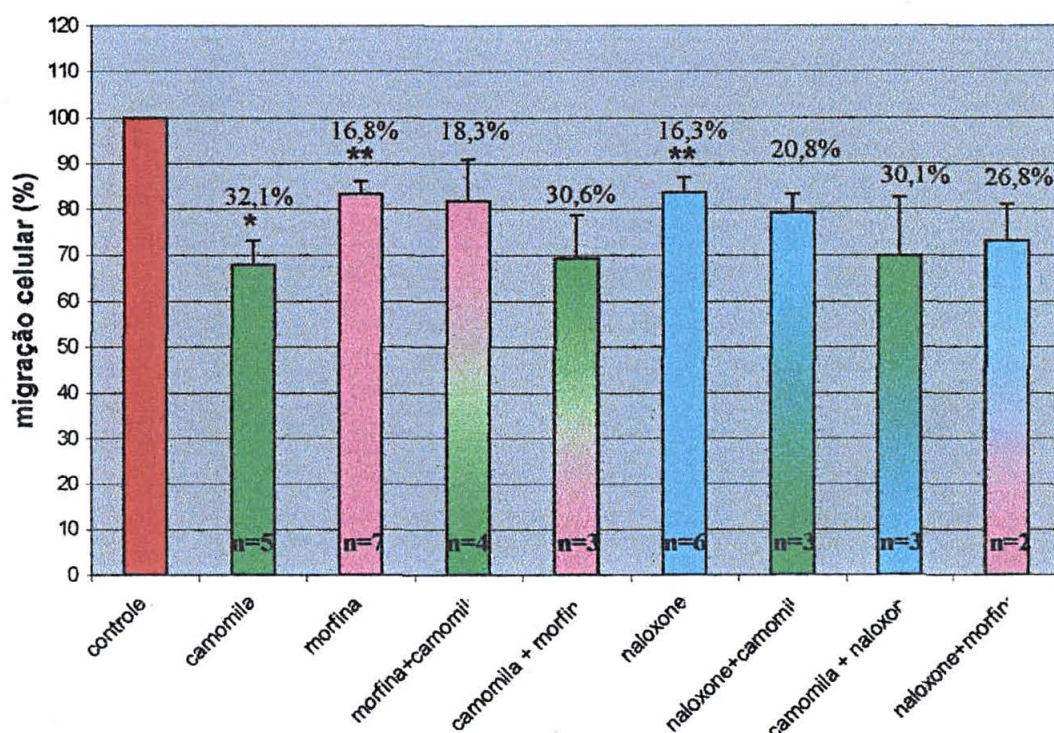


Figura 19. Efeito do extrato hidroalcoólico de camomila e de drogas opióides sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. Leucócitos de doadores sadios foram pré-tratados com extrato de camomila egípcia ($0,1\mu\text{g/ml}$) ■, morfina (10^{-7} M) ■ e naloxona (10^{-7} M) ■, isolados e em associação e, então, submetidos à migração induzidos por caseína a 1% (p/v) em câmara de Boyden, por 90 minutos, a 37°C. As colunas representam a porcentagem de PMN migrados em relação à população não-tratada ■, normalizada em 100% (n = 2 a 7; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ - Teste t student).

Para a morfina, $83,2 \pm 2,9\%$ ($n = 7$; $p \leq 0,01$) dos PMN foram recuperados no compartimento inferior do sistema quando comparados às populações não tratadas. Para a naloxona, esses valores foram de $83,7 \pm 3,3\%$ ($n = 6$; $p \leq 0,01$), muito próximos aos observados para a morfina. Quando naloxona e morfina foram testadas simultaneamente, um efeito inibitório aditivo, porém parcial, na migração leucocitária foi observado, com somente $73,2 \pm 7,9\%$ ($n = 2$) de PMN migrando ativamente.

Embora o tratamento simultâneo com os opióides não tenha sido estatisticamente significativo (provavelmente pelo número pequeno de experimentos), nossos resultados estão de acordo com os efeitos inibitórios relatados tanto para a morfina como para a naloxona, quando independentemente testadas em condições similares ou usando agentes quimioatraentes diferentes da caseína, como fMLP ou soro ativado (Marcoli *et al* 1988, Pasotti *et al* 1992). Além disso, eles são sugestivos de que a caseína interage com os mesmos receptores opióides com os quais a morfina e a naloxona, isoladamente, têm afinidade.

Assim, o efeito aditivo observado quando as duas drogas foram usadas no ensaio, sugere que a caseína interage com receptores que são comuns à morfina e à naloxona, demonstrado pela redução parcial do efeito inibitório. De fato, a morfina é uma droga agonista clássica que parece ligar-se especificamente a receptores opióides do subtipo μ_3 enquanto a naloxona atua em pelo menos três tipos de receptores, de forma seletivamente diferente, ou seja, $\mu > \delta > \kappa$ (Baker & Meert 2002).

Importante, neste contexto, é destacar que todos esses tipos de receptores já foram descritos na superfície de PMN (Carr *et al* 1988, Carr *et al* 1989, Makman *et al* 1995). Porém, essa nossa hipótese deve ser melhor investigada repetindo-se esses ensaios, mas de forma competitiva entre as partes testadas, onde fixar-se-ia a concentração de uma das drogas e usar-se-ia doses variáveis da outra (e/ou vice-versa).

Um aspecto interessante desta série de experimentos relaciona-se ao contrastante efeito aditivo da atividade quimiotática dos PMN encontrado quando estes foram primeiro tratados com a naloxona e, em seguida, pela morfina. A

literatura é farta em mostrar que a naloxona é uma droga antagonista “clássica”, que inibe a ligação da morfina e conseqüentemente a maior parte das atividades dessa droga, em particular aquelas relacionadas às atividades funcionais dos leucócitos (Rang *et al* 2001).

Com relação à quimiotaxia de leucócitos, este antagonismo têm sido amplamente descrito, mas deve ser ressaltado que a maioria, senão todos, os estudos utilizam substâncias outras que a caseína, como o fMLP, TNF- α ou citocinas, particularmente as IL-1 e IL-8, como agentes quimioatraentes (Perez - Castrillon *et al* 1992, Makman *et al* 1995, Chao *et al* 1997, Grimm *et al* 1998a, Grimm *et al* 1998b). Como relatos de efeitos dessas drogas em combinação sobre essa atividade induzida pela caseína não foram encontrados, nossos resultados adicionam mais um tipo de atividade à já ampla lista de ações farmacológicas descritas para essas drogas.

Com os resultados obtidos decorrentes do uso de opióides em nosso sistema, decidiu-se investigar a possibilidade de que o efeito inibitório na migração de PMN causado pelo extrato hidroalcóolico de camomila pudesse ser mediado via receptor opióide.

Numa primeira série de experimentos, leucócitos humanos foram tratados por 10 minutos a 37°C, com morfina e naloxona independentemente, seguindo-se uma incubação, por 30 minutos a 37°C, com extrato hidroalcóolico de camomila egípcia (0,1mg/ml), antes de serem submetidos ao ensaio de migração induzido pela caseína. Na segunda série de experimentos, alterou-se a ordem dos tratamentos, ou seja, os leucócitos foram primeiro tratados com o extrato e, depois, com a morfina ou com a naloxona.

Enquanto o tratamento com extrato de camomila mostrou uma diminuição significativa da migração de PMN ($67,9 \pm 5,4\%$; $n = 5$; $p \leq 0,05$), já anteriormente demonstrada, tratamento prévio com a morfina ou com a naloxona levaram a uma diminuição dessa atividade, quando $81,7 \pm 9,2\%$ ($n = 4$) e $79,2 \pm 4,1\%$ ($n = 3$), respectivamente, de PMN foram recuperados.

Por outro lado, ao tratar os leucócitos primeiramente com extrato de camomila e, em seguida, com morfina ou naloxona, o efeito inibitório observado foi

mais intenso do que o obtido com a combinação anterior, com uma percentagem de $69,4 \pm 9,3\%$ ($n = 3$; $p \leq 0,05$) e $69,9 \pm 12,7\%$ ($n = 3$) de PMN recuperados, respectivamente.

Nos experimentos em que os leucócitos foram primeiramente tratados com os opióides e, em seguida, com o extrato de camomila, observou-se que os ~18% e ~20% de inibição obtidos quando morfina e naloxona foram usados, respectivamente, foram similares à inibição apresentada quando os leucócitos foram incubados somente com os opióides (~16%). Quando tratou-se os leucócitos primeiro com extrato de camomila e, posteriormente, com os opióides, a inibição observada de ~30% aproximou-se àquela resultante quando somente o extrato foi testado (~32%).

Com estas duas séries de experimentos, foi possível observar que o tratamento com morfina ou naloxona parece ter impedido que a camomila exercesse seu efeito inibitório sobre a quimiotaxia dos PMN e vice-versa, sugerindo que o efeito dessa planta na migração dos neutrófilos possa envolver receptores opióides e, além disso, de diferentes tipos. Para um melhor esclarecimento dessa hipótese seria necessário, por exemplo, executar esses experimentos tratando-se previamente os leucócitos com substâncias que bloqueiam especificamente os diferentes tipos de receptores opióides antes de submetê-los ao tratamento com o extrato de camomila seguida dos ensaios de quimiotaxia.

Nossos resultados são de particular relevância do ponto de vista terapêutico. Como a camomila, na forma de extrato hidroalcoólico, mostrou atividade inibitória na locomoção de PMN por interagir com receptores opióides, é possível que seu uso popular, principalmente na forma de chás, para o tratamento e/ou alívio de distúrbios relacionados à má digestão, cólicas intestinais (principalmente em crianças de tenra idade) e sedativo esteja relacionado à sua capacidade de interagir com receptores opióides, os quais têm distribuição ubíqua no organismo dos mamíferos, particularmente nos sistemas nervoso e gastrointestinal (Rang *et al* 2001).

O conjunto de dados apresentados neste estudo revelaram alguns aspectos interessantes e desconhecidos com relação à atividade farmacológica da camomila. Embora esta planta seja uma das mais bem estudadas por causa de seus amplos e benéficos efeitos medicinais, não há relatos referentes à sua forma de ação sobre a atividade migratória de células que participam direta e ativamente da resposta inflamatória.

Como muitos compostos com atividades biológicas definidas já foram isolados desta planta, de particular interesse seria investigar quais corresponderiam aos efeitos aqui relatados para o extrato hidroalcólico.

Os dados aqui apresentados e as considerações que deles puderam ser derivadas acrescentam evidências adicionais às ações antiinflamatórias amplamente descritas para a camomila, dos quais efeitos terapêuticos podem ser explorados.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antiinflamatório das plantas *Anchieta pyrifolia* (Mart.) G. Don, *Hybanthus bigibbosus* (St-Hil.) Hassler e *Rauwolfia sellowii* Muell. Arg, conhecidas popularmente como cipó-suma, canela-de-veado e pau-pra-tudo, respectivamente, as quais vêm sendo usadas popularmente pelos seus efeitos medicinais. Incluiu-se neste trabalho, a *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, a popular camomila, por ser uma planta dotada de diversos efeitos antiinflamatórios comprovados cientificamente.

Dentre os vários processos metabólicos envolvidos na resposta inflamatória, investigou-se, particularmente, o efeito dessas plantas sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos, usando o método *in vitro* idealizado por Boyden.

Para alcançar este objetivo, a parte experimental deste trabalho envolveu três fases. A primeira consistiu na padronização da técnica de migração leucocitária em câmara de Boyden. O preparo das matérias-primas vegetais constituiu, então, a segunda fase, a qual envolveu a coleta, dessecação e a preparação dos extratos hidroalcóolicos das plantas escolhidas. Na terceira etapa, esses extratos foram testados no modelo biológico *in vitro* proposto.

Dos resultados obtidos com os ensaios de quimiotaxia, apresentados e discutidos nas seções anteriores, foi possível estabelecer que (1) a concentração ideal de caseína para induzir o máximo de migração de PMN humanos, sejam eles provenientes de indivíduos sadios ou portadores de processos inflamatórios, foi a de 1%; (2) o tempo de incubação mínimo necessário para que ocorresse máxima migração foi de 90 minutos, independente da fonte de leucócitos humanos usados e, finalmente, que (3) a caseína usada demonstrou capacidade de induzir não só quimiocinese, mas também potente atividade quimiotática em leucócitos humanos.

Por outro lado, os ensaios de quimiotaxia de leucócitos humanos induzidos a migrar contra um gradiente de caseína realizados demonstraram atividade inibitória, de intensidade variável, para cada um dos extratos testados. Notável,

significativo e até agora não relatado foi o efeito inibitório causado pelos extratos de pau-pra-tudo, canela-de-veado e, particularmente, o de camomila, que se assemelharam ao mediado pela DEXA.

Neste contexto, um aspecto particularmente interessante refere-se às amostras de camomila nacional e importada testadas, onde uma diferença de concentração 100 vezes maior entre elas foi necessária para promover atividade farmacológica semelhante. Análise por CG-EM dos seus óleos essenciais, obtidos por hidrodestilação, revelaram diferenças quantitativas referentes aos óxidos A e B do α -bisabolol.

Embora surpreendente, não foi possível associar a atividade biológica demonstrada pelos extratos à presença de um componente ou grupo químico específico.

Um outro aspecto que vale a pena ser destacado, decorrente dos estudos da influência dos extratos sobre a quimiotaxia dos leucócitos, foi o observado para o extrato de camomila. Numa tentativa de esclarecer seu mecanismo de ação, nossos estudos demonstraram uma provável mediação desses efeitos via receptores opióides, o que poderia justificar seu amplo uso popular como estomáquica e sedativa.

Estudos mais aprofundados são necessários, particularmente para esclarecer os mecanismos responsáveis pela atividade biológica aqui investigada em níveis celular e molecular. Muitos dos resultados apresentados neste estudo ainda não foram relatados e constituem uma base rica de dados científicos referentes às atividades farmacológicas dessas plantas, que pode servir como fonte preliminar de informações para investigações futuras.

REFERÊNCIAS

- Aggag, M.E. & Yousef, R.T. (1972) Study of antimicrobial activity of chamomile oil. *Plant Med*, **22**, 140-144.
- Ahmed, F.H., El Badri, A.A., Ibrahim, M.M.K., El Shahed, A.S. & El Khalafawy, H.M.M. (1994) Comparative studies of antifungal potentialities for some natural plant oils against different fungi isolated from poultry. *Grasas y Aceites*, **45**, 260-264.
- Akca, O., Doufas, A.G. & Sessler, D.I. (2002) Use of selective opiate receptor inhibitors to prevent postoperative ileus. *Minerva Anesthesiol*, **68**, 162-165.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of The Cell*. New York.
- Altman, L.C., Hill, J.S., Hairfield, W.M. & Mullarkey, M.F. (1981) Effects of corticoids on eosinophil chemotaxis and adherence. *J Clin Invest*, **67**, 28-36.
- Amirghofran, Z., Azadbakht, M. & Karimi, M.H. (2000) Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol*, **72**, 167-172.
- Ammon, H.P., Sabieraj, J. & Kaul, R. (1996) Chamomile: mechanisms of anti-inflammatory activity of chamomile extracts and components. *Deutsche Apotheker Zeitung*, **136**, 17-18.
- Armarego, W.L.F. & Perinn, D.D. (1996) *Purification of laboratory chemicals*. Butterworth Heinemann, Oxford.
- Avalonne, R., Zanolli, P., Corsi, L., Cannazza, G. & Baraldi, M. (1996) Benzodiazepine-like compounds and GABA in flower heads of *Matricaria chamomilla*. *Phytother Res*, **10**, S177-S179.
- Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392**, 565-568.
- Baggiolini, M. & Moser, B. (1997) Blocking chemokine receptors. *J Exp Med*, **186**, 1189-1191.
- Baker, A.K. & Meert, T.F. (2002) Functional effects of systemically administered agonists and antagonists of μ , δ , and κ opioid receptor subtypes on body temperature in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 1253-1264.
- Barnes, P.J. (1993) Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 439-441.
- Batista, C.V.F., Schripsema, J., Verpoorte, R., Rech, S.B. & Henriques, A.T. (1995) Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. *Phytochemistry*, **41**, 969-973.
- Berry, M. (1995) Herbal Products. Part 6. Chamomilles. *Pharmaceutical Journal*, **254**, 191-193.
- Bertolucci, M., Perego, C. & De Simoni, M.G. (1996) Central opiate modulation of peripheral IL-6 in rats. *Neuroendocrinol*, **7**, 1181-1184.
- Bian, T.H., Wang, X.F. & Li, X.Y. (1995) Effect of morphine on interleukin-1 and tumor necrosis factor α production from mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Acta Pharmacol. Sin.*, **16**, 449-451.
- Birt, D.F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P. & Pinch, H.C. (1997) Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res*, **17**, 85-91.

- Bock, O. & Mrowietz, U. (2001) Development of a new method of analysing chemotactic deactivation of human neutrophil granulocytes. *J Biochem Biophys Methods*, **48**, 257-268.
- Bokoch, G.M. (1995) Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, **86**, 1649-1660.
- Boyden, S. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, **115**, 453-466.
- Bradley, R.P. (ed.) (1992) *British Herbal Compendium*. British Herbal Medicine Association, Bournemouth.
- Brantl, V. (1984) Novel opioid peptides derived from β - casein: human β - casomorphins. *Eur J Pharmacol*, **106**, 213-214.
- Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. & Lottspeich, F. (1979) Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1211-1216.
- Brown, D.J. & Dattner, A.M. (1998) Phytotherapeutic approaches to common dermatologic condition. *Arch Dermatol*, **134**, 1401-1404.
- Broxmeyer, H.E. & Kim, C.H. (1999) Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol*, **27**, 1113-1123.
- Brunn, J.M., Pedersen, S.B. & Richelsen, B. (2001) Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 1267-1273.
- Bryant, H.U., Yoburn, B.C., Inturrisi, C.E., Bernton, E.W. & Holaday, J.W. (1988) Morphine-induced immunomodulation is not related to serum morphine concentration. *Eur. J. Pharmacol.*, **149**, 165-169.
- Bussiere, J.L., Adler, M.W., Rogers, T.L. & Eisenstein, T.K. (1993) Cytokine reversal of morphine-induced suppression of the antibody response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 591-597.
- Cabot, P.J. (2001) Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **28**, 230-232.
- Carr, D.J., Brockunier, L.L., M., S., Bagley, J.R. & France, C.P. (1996) Mirfentanil antagonizes morphine-induced suppression of splenic NK activity in mice. *Immunopharmacol.*, **34**, 9-16.
- Carr, D.J., deCosta, B.R., Kim, C.H., Jacobson, A.E., Gracacello, K.C., Rice, K.C. & Blalock, J.E. (1989) Opioid receptors on cells of the immune system: evidence for δ - and κ -classes. *J. Endocrinol.*, **122**, 161-168.
- Carr, D.J., Kim, C.H., de Costa, B., Jacobson, A.E., Rice, K.C. & Blalock, J.E. (1988) Evidence for a δ -class opioid receptor on cells of the immune system. *Cell. Immunol.*, **116**, 44-51.
- Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Caska, M., Ferro, I., Baggiolini, M. & Berton, G. (1992) IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.*, **148**, 3216-3220.
- Cassatella, M.A. (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today*, **16**, 21-26.
- Chadzinska, M., Kolaczowska, E., Seljelid, R. & Plytycz, B. (1999) Morphine modulation of peritoneal inflammation in atlantic salmon and CB6 mice. *J Leukoc Biol*, **65**, 590-596.

- Chang, M.M.-J., Juarez, M., Hyde, D.M. & Wu, R. (2001) Mechanism of dexamethasone-mediated interleukin-8 gene suppression in cultured airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **280**, 1107-1115.
- Chao, C.C., Hu, S., Shark, K.B., Sheng, W.S., Gekker, G. & Peterson, P.K. (1997) Activation of μ opioids receptors inhibits microglial cell chemotaxis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **281**, 998-1003.
- Chaumontet, C., Droumaguet, C., Bex, V., Heberden, C., Gallard-Sanchez, I. & Martel, P. (1997) Flavonoids (apigenin, tangeretin) counteract tumor promoter-induced inhibition of intercellular communication of rat liver epithelial cells. *Cancer Letters*, **114**, 207-210.
- Chen, X., Oppenheim, J. & Howard, Z.O.M. (2001) Shikonin, a component of antiinflammatory chinese herbal medicine, selectively blocks chemokine binding to CC chemokine receptor-1. *Inter Immunopharmacol*, **1**, 229-236.
- Chretien, J.H. & Garagusi, V.F. (1972) Corticosteroid effect on fagocytosis and NBT reduction by polymorphonuclear neutrophils. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **11**, 358-367.
- Chuang, T.K., Killam Jr., K.F., Chuang, L.F., Kung, H.F., Shen, W.S., Chao, C.C., Yu, L. & Chuang, R.Y. (1995) *Mu* receptor gene expression in immune cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 922-930.
- Chung, C.Y., Potikyan, G. & Firtel, R.A. (2001) Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell*, **7**, 937-947.
- Clark, R.A.F., Gallin, J.I. & Fauci, A.S. (1979) Effects of *in vivo* prednisone *in vitro* eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. *Blood*, **53**, 633-641.
- Comandon, J. (1917) Phagocytose *in vitro* des hematozoaires de Calfat. *Complex Rendas Soc. Biol.*, **80**, 314.
- Cotran, R.S., Kumar, V. & Robbins, S.L. (1994) *Robbins - Pathologic basis of disease*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Dacie, J.D. & Lewis, S.M. (1995) *Practical Haematology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- De Bruyn, W. apud Wilkinson, P. C. 1974.
- De Haij, S., Woltman, A.M., Bakker, A.C., Daha, M.R. & Van Kooten, C. (2002) Production of inflammatory mediators by renal epithelial cells is insensitive to glucocorticoids. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 197-204.
- Dekker, L.V. & Segal, A.W. (2000) Signals to move cells. *Science*, **287**, 982-984.
- Devreotes, F.N. & Zigmond, S.H. (1988) Chemotaxis in eucaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 649-686.
- Dixon, H.M. & McCutcheon, M. (1938) Studies in chemotropism. Source of substances attracting polymorphonuclear leukocytes to bacteria. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.*, **38**, 378-381.
- Dudez, T.S., Chanson, M., Schlegel-Haueter, S.E. & Suter, S. (2002) Characterization of a novel chemotactic factor for neutrophils in the bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, **186**, 774-781.
- Eisenstein, T.K., Meissler, J.J., Rogers, T.J., Geller, E.B. & Adler, M.W. (1995) Mouse strain differences in immunosuppression by opioids *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1484-1489.
- Eisentein, T.K., Taub, D.D., Adler, M.W. & Rogers, T. (1991) The effect of morphine and DAGO on the proliferative response of murine splenocytes. In: *Drugs of Abuse*,

- Immunity, and Immunodeficiency* (ed. by H. Friedman, T.W. Klein & S. Specter), pp. 203-209. Plenum Press, New York.
- Eldin, S. & Dunford, A. (2001) *Fitoterapia na atenção primária à saúde*. Manole, São Paulo.
- Farmacopéia, C.d.R.d. (1959) *Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. Siqueira, São Paulo.
- Farmacopéia, C.P.d.R.d. (1996) *Farmacopéia Brasileira*. p. 74. Atheneu, São Paulo.
- Farrell, H.M., Qi, P.X., Brown, E.M., Cooke, P.H., Tunick, M.H., Wickham, E.D. & Unruh, J.J. (2002) Molten globule structures in milk proteins: implications for potential new structure-function relationships. *J Dairy Sci*, **85**, 459-471.
- Fiat, A.M., Migliore-Samour, D. & Jollès, P. (1991) Biological active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J Dairy Sci*, **76**, 301-310.
- Forster, H.B., Niklas, H. & Lutz, S. (1980) Antiespasmotic effects of some medicinal plants. *Planta Medica*, **40**, 309-319.
- Fowler, C.J. & Fraser, G.L. (1994) *Mu-, delta-, kappa*-opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. *Neurochem. Int.*, **25**, 433-437.
- Foxman, E.F., Campbell, J.J. & Butcher, E.C. (1997) Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol*, **139**, 1349-1360.
- Freier, D.O. & Fuchs, B.A. (1994) A mechanism of action for morphine-induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine-induced suppression of natural killer cell activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 1127-1133.
- Fuchs, B.A. & Pruett, S.B. (1993) Morphine induced apoptosis in murine thymocytes in vivo but not in vitro: involvement of both opiate and glucocorticoid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 417-423.
- Furie, M.B. & Randolph, G.J. (1995) Chemokines and tissue injury. *Am. J. Pathol.*, **146**, 1287.
- Gattegno, L., Migliore-Samour, D., Saffar, L. & Jollès, P. (1988) Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immuno. Lett.*, **18**, 27.
- Gerristein, M.E., Carley, W.W., Ranges, G.E. & al, e. (1995) Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am. J. Pathol.*, **147**, 278-292.
- Glowania, H.J., Rauln, C. & Swoboda, M. (1987) Effect of chamomile on wound healing - a clinical double-blind study. *Z Hautkr*, **62**, 1262-1271.
- Godoy, R.J. & Kitchen, I. (2000) Influence of maternal milk on functional activation of δ -opioid receptors in postnatal rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **296**, 744-748.
- Gomes, I., Filipovska, J., Jordan, B.A. & Devi, L.A. (2002) Oligomerization of opioid receptor. *Methods*, **27**, 358-365.
- Grimm, M.C., Ben-Baruch, A., Taub, D.D., Howard, O.M.Z., Resau, J.H., Wang, J.M., Ali, H., Richardson, R., Snyderman, R. & Oppenheim, J.J. (1998a) Opiates transdeactivate chemokine receptors: δ and μ opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *J Exp Med*, **188**, 317-325.

- Grimm, M.C., Ben-Baruch, A., Taub, D.D., Howard, O.M.Z., Wang, J.M. & Oppenheim, J.J. (1998b) Opiate inhibition of chemokine induced chemotaxis. *Ann. NY Acad. Sci.*, **840**, 9-20.
- Hallet, M.B., Davies, E.V. & Campbell, A.K. (1990) Oxidase activation in individual neutrophils is dependent on the onset and magnitude of the Ca^{+2} signal. *Cell Calcium*, **11**, 655-663.
- Haston, W.S. & Wilkinson, P.C. (1987) Gradient perception by neutrophil leucocytes. *J Cell Sci*, **87**, 373-374.
- Haston, W.S. & Wilkinson, P.C. (1988) Visual methods for measuring leukocyte locomotion. *Methods Enzymol*, **162**, 17-38.
- Hernández-Ceruelos, A., Madrigal-Bujaidar, E. & De La Cruz, C. (2002) Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicology Lett*, **135**, 103-110.
- Hill, H.R., Gerrard, J.M., Hogan, N.A. & Quie, P.G. (1974a) Hyperactivity of neutrophil leukotactic responses during active bacterial infection. *J. Clin. Invest.*, **53**, 996-1002.
- Hill, H.R., Kaplan, E.L., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. & Quie, P.G. (1974b) Leukotactic activity and reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophil granulocytes from patients with streptococcal skin infection. *J. Infect. Dis.*, **129**, 322-326.
- Hofbauer, R., Frass, M., Gmeiner, B., Handler, S., Speiser, W. & Kapiotis, S. (1999) The green tea extract epigallocatechin gallate is able to reduce neutrophil transmigration through monolayers of endothelial cells. *Wien Klin. Wochenschr.*, **111**, 278-282.
- Hofbauer, R., Frass, M., Gmeiner, B., Kaye, A.D. & Frost, E.A. (2000) Garlic extract (*Allium sativum*) reduces migration of neutrophils through endothelial cell monolayers. *Middle East J. Anesthesiol*, **15**, 649-658.
- Hofbauer, R., Frass, M., Gmeiner, B., Kaye, A.D. & Frost, E.A. (2001) Effects of garlic extract (*Allium sativum*) on neutrophil migration at the cellular level. *Heart Dis.*, **3**, 14-17.
- Inhantola-Vormisto, A., Summanen, J., Kankaanranta, H., Vuorela, H., Asmawi, Z.M. & Moilanen, E. (1997) Anti-inflammatory activity of extracts from leaves of *Phyllanthus emblica*. *Planta Med*, **63**, 518-524.
- Irakam, A., Miskolci, V., Vancurova, I. & Davidson, D. (2002) Dose-related inhibition of proinflammatory cytokine release from neutrophils of the newborn by dexamethasone, betamethasone, and hydrocortisone. *Biol. Neonate*, **82**, 89-95.
- Isaac, O. (1979) Pharmacological investigations with compounds of chamomile I. on the pharmacology of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. *Plant Med*, **35**, 118-124.
- Jakolev, V. & Isaac, O. (1979) Pharmacological investigations with compounds of chamomile. II New investigations on the antiplogistic effects of (-)- a-bisabolol and bisabolol oxides. *Planta Med*, **35**, 125-140.
- Jakolev, V., Isaac, O. & Flaskamp, E. (1983) Pharmacological investigations with compounds of chamomile. VI Investigations on the anyiphlogistic effects of chamazulene and matricine. *Planta Med*, **49**, 67-83.
- Johansson, S., Göransson, U., Luijeendijk, T., Backlund, A., Claeson, P. & Bohlin, L. (2002) A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J. Nat. Prod.*, **65**, 32-41.

- Kampa, M., Loukas, S., Hatzoglou, A., Martins, P., Martin, P.-M. & Castanas, E. (1996) Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α_{s1} casein (α_{s1} -casomorphin amide). *Biochem. J.*, **319**, 903-908.
- Kedzia, B. (1991) Antimicroorganisms activity of oil Chamomillae and its components. *Herba Polonica*, **37**, 29-38.
- Keller, H.U., Wilkinson, P.C., Abercrombie, M. & al, e. (1977) A proposal for the definition of terms related to locomotion of leukocyte and other cells. *J Immunol*, **118**, 1912-1914.
- Korting, H.C., Schaefer, K., M., Hart, H., Laux, P. & Schmid, M. (1993) Anti-inflammatory activity of hamamelis distillate applied topically to the skin influence of vehicle and dose. *Eur J Clin Pharmacol*, **44**, 315-318.
- Krukowski, Z.H. (1978) *Studies of polymorphonuclear neutrophil leukocyte function in relation to surgical practice*. p. 201p. University of Aberdeen.
- Kwon, O.J., Au, B.T., Collins, P.D., Baraniuk, J.N., Adcock, I.M., Chung, K.F. & Barnes, P.J. (1994) Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells. *Immunology*, **81**, 389-394.
- Leber, T. (1888) Über die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der entzündungserregenden. *Schädlichkeiten Fortschriu. Med.*, **4**, 460-464.
- Lee, G.R., Foerster, J., Lukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P. & Rodgers, G.M. (1999) *Wintrobe's clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Lewis, S.L. & Van Epps, D.E. (1983) Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation*, **7**, 363-375.
- Lomas, D.A., Chamba, M.I.A. & Stockley, R.A. (1991) The effect of *in vitro* and *in vivo* dexamethasone on human neutrophil function. *Agents and Actions*, **33**, 279-285.
- Lloyd, A.R. & Oppenheim, J.J. (1992) Poly's lament; the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today*, **13**, 169-172.
- Lu, T., Cantrell, C.L., Robbs, S.L., Franzblau, S.G. & Fisher, N.H. (1998) Antimycobacterial matricaria esters and lactones from Asteracea species. *Plant Med*, **64**.
- MacGregor, R.R. (1976) The effect of anti-inflammatory agents and inflammation on granulocyte adherence. *Am. J. Med.*, **61**, 597-607.
- MacGregor, R.R., Spagnuolo, P.J. & Lentnek, L.L. (1974) Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisolone and aspirin, measured with an assay system. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 642-646.
- Machelska, H., S.A., M., Brack, A., Schopohl, J.K., Rittner, H.L., Schäfer, M. & Stein, C. (2002) Opioid control of inflammatory pain regulated intercellular adhesion molecule-1. *J Neurosci*, **22**, 5588-5596.
- Mackai, I.R. & Rosen, F.S. (2000) T-cell function and migration. *N Engl J Med*, **343**, 1020-1034.
- Makman, M.H., Bilfinger, T.V. & Stefano, G.B. (1995) Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J. Immunol.*, **154**, 1323-1330.
- Manica, J.c. (1997) *Anestesiologia - Princípios e Técnica*. Artes Médicas, Porto Alegre.
- Mann, C. & Staba, E.J. (1986) *The chemistry, pharmacology, and commercial formulations of chamomile. Herbs, spices and medicinal plants*. Onyx Press, Phoenix.

- Mans, D.R.A., Rocha, A.B. & Schwartzmann, G. (2000) Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*, **5**, 185-198.
- Marcoli, M., Ricevuti, G., Mazzone, A., Bekkering, M., Lechini, S. & Frigo, G.M. (1988) Opioid-induced modification of granulocyte function. *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**, 425-433.
- Martin, R.R., Warr, G., Cough, R. & Knight, V. (1973) Chemotaxis of human leukocytes: responsiveness to *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Lab. Clin. Med.*, **81**, 520-529.
- Martinez, L.L., Oliveira, M.A. & Fortes, Z.B. (1999) Influence of verapamil and diclofenac on leukocyte migration in rats. *Hypertension*, **34**, 997-1001.
- Mascolo, N., Pinto, A. & Capasso, F. (1988) Flavonoids, leukocyte migration and eicosanoids. *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 293-295.
- Massote, D., Brillet, K., Kieffer, B. & Milligan, G. (2002) Agonists activate $G_{i1}\alpha$ or $G_{i2}\alpha$ fused to the human μ opioid receptor differently. *J Neurochem*, **81**, 1372-1382.
- Matos, F.J.A. (1988) *Introdução a fitoquímica experimental*. Ed. UFC, Fortaleza, Brasil.
- Mazzone, A., Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., Canale, C. & Ricevuti, G. (1996) Opioid receptor and phagocyte defects in drug addicts. *Recenti Prog Med*, **87**, 530-537.
- Mazzone, A., Mazzucchelli, I., Fossati, G., Gritti, D., Fea, M. & Ricevuti, G. (1994) Granulocyte defects and opioid receptors in chronic exposure to heroin or methadone in humans. *Int. J. Immunopharmac.*, **16**, 959-967.
- McCutcheon, M. & Dixon, H.M. (1936) Chemotropic reactions of polymorphonuclear leukocytes to various microorganisms - a comparison. *Arch. Pathol.*, **21**, 749-755.
- McGillen, J. & Phair, J. (1979) Polymorphonuclear leukocyte adherence to nylon: effect of oral corticosteroids. *Infect. Immun.*, **26**, 542-546.
- McNeill, G.W., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., T.S., F., Nicholson, D.H., Silva, P.C., Skog, J.E., Thehane, P., Turland, N.J. & Hawksworth, D.L. (2000) *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)*. Königstein, Koeltz Scientific Books.
- Meisel, H. (1997) Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopoly*, **43**, 119-128.
- Menezes, P.R., Contin, A., Schwarz, E.A. & Santos, C.A.M. (2002) *Atividade antioxidante de espécies de uso medicinal coletadas na região da Usina Hidroelétrica Salto Caxias*. In: XVII Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá, Brasil.
- Merchant, D., Kahn, R. & Murphy, W. (1964) *Handbook of cell and organ culture*. Burgess Publishing, Broken Arrow.
- Metchnikoff, E. (1893) *Lectures on the comparative pathology of inflammation*. Kegan Paul, London.
- Miale, J.B. (1982) *Laboratory medicine - hematology*. C.V. Mosby Co, St. Louis.
- Miller, T., Wittstock, U., Lindequist, U. & Teuscher, E. (1996) Effects of some components of the essential oil of chamomile, *Chamomile recutita* on histamine release from rat mast cells. *Planta Med*, **62**, 60-61.
- Miyagi, T., Chuang, L.F., Lam, K.M., Kung, H.-f., Wang, J.M., Osburn, B.I. & Chuang, R.Y. (2000) Opioids suppress chemokine-mediated migration of monkey neutrophils and monocytes - an instant response. *Immunopharmacology*, **47**, 53-62.

- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G. & Meunier, J.C. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.*, **341**, 33-38.
- Molochko, V.A. & Lastochkina, T.M. (1990) The antistaphylococcal proprieties of plant extracts in relation to their prospective use as therapeutic and prophylatic formulations for the skin. *Vestn Dermatol Venerol*, **8**, 54-56.
- Mori, S., Goto, K., Goto, F., Murakami, K., Ohkawara, S. & Yoshinaga, M. (1994) Dynamic changes in mRNA expression of neutrophils during the course of acute inflammation in rabbits. *Int. Immunol.*, **6**, 149-156.
- Mota, M.L., Thomas, G. & Barbosa Filho, J.M. (1985) Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J. Ethnopharmacol.*, **13**, 289-300.
- Muller, A.A., Reiter, S.A., Heider, K.G. & Wagner, H. (1999) Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and antiinflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle scatter and actin polymeryzation of polymorphonuclear granulocytes. *Planta Med*, **65**, 590-594.
- Nathan, C.F. (1989) Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood*, **73**, 301-306.
- Newall, C.A., Anderson, L.A. & Phillipson, J.D. (1996) *"Herbal medicines - a guide for health-care professionals"*. Pharmaceutical Press, London.
- Nock, B., Giordano, A.L., Moore, B.W. & Cicero, T.J. (1993) Properties of the putative *epsilon* opioid receptor: identification in rat, guinea pig, cow, pig and chicken brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, **264**, 349-359.
- Ozaki, Y., Ohashi, T. & Kume, S. (1987) Potential of neutrophil function by recombinant DNA-produced interleukin 1 α . *J. Leukoc. Biol.*, **42**, 621-627.
- Park, H.S., Suh, J.H., Kim, H.Y., Kwon, O.J. & Choi, D.C. (1999) Grain dust induces IL-8 production from bronchial epithelial cells: the effect of dexamethasone on IL-8 production. *Ann. Allergy Asthma Immunol*, **82**, 371-374.
- Pasotti, D., Mazzone, A. & Ricevuti, G. (1992) Sistema nervoso e sistema immunitario: ruolo della morfina e dei peptidi oppioidi su alcune funzioni dei granulociti neutrofili. *Minerva Med*, **83**, 433-438.
- Perez-Castrillon, J.L., Perez-Arellano, J.L., Garcia-Palomo, J.D., Jimenez-Lopez, A. & De-Castro, S. (1992) Opioids depress *in vitro* human monocytes chemotaxis. *Immunopharmacol.*, **23**, 53-61.
- Perreti, M. & Flower, R.J. (1993) Modulation of IL-1 induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin. *J. Immunol.*, **150**, 992-999.
- Peterson, P.K., Molitor, T.W. & Chao, C.C. (1993) Mechanisms of morphine-induced immunomodulation. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 343-348.
- Pfeffer, W. (1884) *Untersuchungen aus dem Botanischen Institut zu Tübingen*.
- Qu, J., Hosoi, K., Shimojima, T., Oi, T. & Ikeda, K. (1995) Effects of FMLP and LPS on [Ca⁺²]_i of peritoneal exudate polymorphonuclear leukocytes following onset of inflammation. *Periodontal Res*, **30**, 153-158.
- Quesenberry, P.J. & Colvin, G.A. (2000) Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: *Williams Hematology* (ed. by E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, T.J. Kipps & U. Seligsihn), pp. 153-174. McGraw-Hill, New York.

- Rabgaoui, N., Guerin, M.C. & Torreilles, J. (1994) Casein-derived peptides can modulate the production of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in human neutrophils. *Biochem Cell Biol*, **72**, 305-311.
- Ramsey, W.S. (1972a) Analysis of individual leukocyte behavior during chemotaxis. *Exp Cell Res*, **70**, 129-139.
- Ramsey, W.S. (1972b) Locomotion of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Cell Res*, **72**, 489-501.
- Rang, H.P., Dale, M.M. & Ritter, J.M. (2001) *Farmacologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rekka, E.A., Kourounakis, A.P. & Kourounakis, P.N. (1996) Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical process. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, **92**, 361-364.
- Rojavin, M., Szabo, I., Bussiere, J.L., Rogers, T.J., Adler, M.W. & Eisenstein, T.K. (1993) Morphine treatment *in vitro* or *in vivo* decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sci.*, **53**, 997-1006.
- Roth, J.A. & Kaeberle, M.L. (1981) Effects of *in vivo* dexamethasone administration on *in vitro* bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun.*, **33**, 434-441.
- Roy, S., Ramaktishnan, S., Loh, H.H. & Lee, N.M. (1991) Chronic morphine treatment selectively supresses macrophage colony formation in bone marrow. *Eur. J. Pharmacol.*, **195**, 359-363.
- Safayhi, H., Sabieraj, J., Sailer, E.-R. & Ammon, H.P.T. (1994) Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B₄ formation. *Plant Med*, **60**, 410-413.
- Salamon, I. (1992) Chamomile, a medicinal plant. *The Herb, Spice, and Medicinal Plant Digest*, **10**, 1-4.
- Santana-Rios, G., Orner, G.A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.Y. & Dashwood, R.H. (2001) Potent antimutagenic activity of white tea in comparasion with green tea in *Salmonella* assay. *Mutat. Res.*, **495**, 61-74.
- Sarkar, A. & Bhanduri, A. (2001) Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxigen and nitrogen species: comparasion with individual catechin constituents and green tea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1**, 173-178.
- Saúde, M.d. (1996a) *SUS - Construindo um modelo de atenção à saúde para a qualidade de vida*. In: 10ª Conferência Nacional de Saúde (ed. by R. Final), pp. 28-29. Ministério da Saúde, Brasília.
- Saúde, M.d. (1996b) *SUS - Construindo um modelo de atenção à saúde para a qualidade de vida*. In: 10ª Conferência Nacional de Saúde (ed. by R. final), pp. 75-76. Ministério da Saúde, Brasília.
- Savarese, T.M. & Fraser, C.M. (1992) In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J*, **283**, 1-19.
- Scalia, S., Giuffreda, L. & Pallado, P. (1999) Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**, 549-558.
- Schall, T.J. (1994) The chemokines. In: *The Cytokine Handbook* (ed. by A. Thompson), pp. 419-460. Academic Press, London.
- Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewel, C.M., Cidlowski, J.A. & Baldwin, A.S. (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptores. *Mol. Cell Biol*, **15**, 943-953.

- Schinella, G.R., Tournier, H.A., Prieto, J.M., Buschiazzo de, P.M. & Ríos, J.L. (2002) Antioxidant activity of anti-inflammatory plants extracts. *Life Science*, **70**, 1023-1033.
- Schleimer, R.P. (1990) Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am Rev Respir Dis*, **141**, 859-869.
- Sedgwick, A.D. & Willoughby, D.A. (1985) Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: *Handbook of inflammation* (ed. by I.L. Bonta, M.A. Bray & M.J. Parnham), pp. 27-47. Elsevier, New York.
- Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W. & Bourne, H.R. (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*, **287**, 103-106.
- Servant, G., Weiner, O.D., Neptune, E.R., Sedat, J.W. & Bourne, H.R. (1999) Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol Biol Cell*, **10**, 1163-1178.
- Shalaby, M.R., Aggarwal, B.B., Ridernacht, E., Svedersky, L.P., Finkle, B.S. & Palladino, M.A. (1985) Activation of human polymorphonuclear functions by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, **135**, 2069-2073.
- Sheetz, M.P., Felsenfeld, D., Galbraith, C.G. & Caoquet, D. (1999) Cell migration as a five-step cycle. *Biochem. Soc. Symp.*, **65**, 223-243.
- Shen, Y.-C., Chou, C.-J., Chiou, W.-F. & Chen, C.-F. (2001) Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix *Stephaniae tetrandrae*: comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Molecular Pharmacology*, **60**, 1083-1090.
- Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de-Lima Jr, O., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernandez-Ferreira, E., Soares, R.O.A., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimarães, A.C., Zoghbi, M.G.B. & Henriques, M.G.M.O. (1999) Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J Ethnopharmacol*, **66**, 57-69.
- Siani, A.C., Sampaio, A.L.F., Sousa, M.C., Henriques, M.G.M.O. & Ramos, M.F.S. (2000) *Óleos essenciais*. In: *BioTecnologia - Ciência e desenvolvimento*, Vol. 3, pp. 38-43.
- Siddiqui, R.A., Akard, L., P., Garcia, J.G.N., Cui, Y. & English, D. (1999) Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes. *J Immunol*, **162**, 1077-1083.
- Silva, G.L.C., Gaertner, P., Marson, P.G., Schwartz, E.A. & Santos, C.A.M. (2003) *An ethno-pharmacobotanical survey in Santo Caxias Hydroelectric in Paraná State, Brazil, before flooding*. *J Ethnopharmacol*.
- Silva, M.O.R. (1978) Brief history of inflammation. In: *Handbook of experimental pharmacology* (ed. by J.R. Vane & S.H. Ferreira), pp. 6-25. Springer-Verlag, New York.
- Simchowitz, L. & Spilberg, I. (1979) Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. Evidence for the role of sodium. *J. Immun.*, **123**, 2428-2435.
- Skabo, I., Chen, X.-H., Xin, L., Adler, M.W., Howard, O.M.Z., Oppenheim, J.J. & Rogers, T.J. (2002) Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Prod Nat Ac Sci*, **99**, 10276-10281.
- Smith, C.W., Hollers, J.C., Patrick, R.A. & Hassett, C. (1979) Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. *J. Clin. Invest.*, **63**, 221-229.

- Snyderman, R. & Goetzel, E.J. (1981) Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science*, **213**, 830-837.
- Solymosy, M., Nagy, Z., Toth, G. & Antoni, F. (1986) Interaction of casein with human polymorphonuclear cells. *Biochem Med Metab Biol*, **35**, 293-301.
- Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, **76**, 301-314.
- Springer, T.A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*, **57**, 827-872.
- Stefano, G.B., Digenis, A., Leung, M.K., Bilfinger, T.V., Makman, M.H., Scharrer, B. & Abunrad, N.N. (1993) Opiate-like substances in invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 11099-11103.
- Stinghal, P.C., Sharma, P., Kapasi, A.A., Reddy, K., Franki, N. & Gibbons, N. (1998) Morphine enhances macrophage apoptosis. *J. Immunol.*, **160**, 1886-1893.
- Sugunda, A.G., Amoros, M., Girre, L. & Fauconnier, B. (1983) Inhibitory effects of several crude and semipurified extracts of plants indigenous of France to the multiplication of human Herpesvirus 1 and of human Poliovirus 2 in cell culture. *J Nat Prod*, **46**, 626-632.
- Szalontai, M., Petri-Verzar, G. & Florian, E. (1976) Data on the antifungal effect of the biologically active components of *Matricaria chamomilla* L. *Acta Pharm Hung*, **46**, 232-247.
- Szalontai, M., Petri-Verzar, G. & Florian, E. (1977) Contribution to study of antimycotic effect of biologically active components of *Matricaria chamomilla* L. *Parfuem Kosmet*, **46**, 232-247.
- Szelenyi, I., Isaac, O. & Thiemer, K. (1979) Pharmacological experiments with compounds of chamomile.III. Experimental studies of the ulcerative effect of chamomile. *Planta Medica*, **35**, 218-227.
- Teschemacher, H., Koch, G. & Brantl, V. (1997) Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*, **43**, 99-117.
- Testa, N.G. & Molineux, G. (1993) *Haemopoiesis - a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Thelen, M., Dewald, B. & Baggiolini, M. (1993) Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.*, **73**, 797-821.
- Tobler, A., Meier, R., Seitz, M., Dewald, B., Baggiolini, M. & Fey, M.F. (1992) Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CDSF in human fibroblasts. *Blood*, **79**, 45-51.
- Tubaro, A., Zilli, C., Redaelli, C. & Della Loggia, R. (1984) Evaluation of antiinflammatory activity of a chamomile extract after topical application. 359.
- van Wetering, S., Mannesse-Lazeroms, S.P., Van Sterkenburg, M.A. & Hiemstra, P.S. (2002) Neutrophils defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone. *Inflamm. Res.*, **51**, 8-15.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi De Stein, M. & al, e. (1995) Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med*, **61**, 213-216.
- Volhardt, J. (2000) Natural extracts for baby care. *Cosmet Toiletries*, **115**, 63-73.
- Wagner, J.G. & Roth, R.A. (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*, **52**, 349-374.

- Wang, F.I., Yang, J.W., Hung, S.Y. & Pan, I.J. (2001) In vitro migratory responses of swine neutrophils to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Exp Anim*, **50**, 139-145.
- Ward, P.A. (1966) The chemosuppression of chemotaxis. *J. Exp. Med.*, **124**, 209-225.
- Wei, H., Tye, L., Bresnick, E. & Birt, D.F. (1990) Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res*, **50**, 499-502.
- Wilkinson, P.C. (1972) Characterization of the chemotactic activity of casein for neutrophil leukocytes and macrophages. *Experientia*, **28**, 1051.
- Wilkinson, P.C. (1974a) *Chemotaxis & Inflammation*. Churchill Livingstone Inc, New York.
- Wilkinson, P.C. (1974b) Surface and cell membrane activities of leukocyte chemotactic factors. *Nature*, **251**, 58-60.
- Wilkinson, P.C. (1979) Synthetic peptide chemotactic factors for neutrophils: the range of active peptides, their efficacy and inhibitory activity, and susceptibility of the cellular response to enzymes and bacterial toxins. *Immunology*, **36**, 579-588.
- Wilkinson, P.C. (1980) Leukocyte locomotion and chemotaxis: effects of bacteria and viruses. *Clin Infect Dis*, **2**, 293-318.
- Wilkinson, P.C. (1988a) Chemotactic factors: an overview. *Methods Enzymol*, **162**, 127-133.
- Wilkinson, P.C. (1988b) Micropore filter methods for leukocyte chemotaxis. *Methods Enzymol*, **162**, 38-50.
- Wilkinson, P.C. (1996) Cell locomotion and chemotaxis: basic concepts and methodological approaches. *Methods: A Comp Methods Enzymol*, **10**, 74-81.
- Wilkinson, P.C. (1998) Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *J Immunol Methods*, **216**, 139-153.
- Wilkinson, P.C. & Haston, W.S. (1988) Chemotaxis: an overview. *Methods Enzymol*, **162**, 3-16.
- Willianson, E.M., Okpako, D.T. & Evans, F.J. (1996) Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. In: *Pharmaceutical Methods in Phytotherapy Research*, p. 228. Wiley, Chichester.
- Yamada, K., Miura, T. & Mimaki, Y.S., Y. (1996) Effect of inhalation of chamomile oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress. *Biol. & Pharm. Bulletin*, **19**, 1244-1246.
- Yamaguchi, M., Hirai, K., Nakajima, K., Ohtoshi, T., Takaishi, T., Ohta, K., Morita, Y. & Ito, k. (1994) Dexametasone inhibits basophil migration. *Allergy*, **49**, 371-375.
- Zentay, Z., Sharaf, M., Qadir, M., Drafta, D. & Davidson, D. (1999) Mechanism for dexamethasone inhibition of neutrophil migration upon exposure to lipopolysaccharide *in vitro*: role of neutrophil interleukin-8 release. *Pediatric Research*, **46**, 406-410.
- Zigmond, S.H. (1977) Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol*, **75**, 606-616.
- Zigmond, S.H. (1978) A new visual assay of leukocyte chemotaxis. In: *Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications* (ed. by J.I. Gallin & P.G. Quie), pp. 57-66. Raven Press, New York.
- Zigmond, S.H. (1988) Orientation chamber in chemotaxis. *Methods Enzymol*, **162**, 65-72.

ANEXO I

3.5. -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) A proposta deste projeto é estabelecer um painel de ensaios biológicos *in vitro*, que possam, de forma dinâmica, demonstrar a atividade antiinflamatória de constituintes de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população em processos inflamatórios e, simultaneamente, contribuir para a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos.
- b) Caso você participe da pesquisa, uma quantidade de sangue será destinada a separação dos leucócitos para padronização das técnicas de migração leucocitária. Aos pacientes internados, tal separação se sucederá após a realização dos exames requisitados pelo clínico. Sendo assim, apenas amostras previamente prescritas pelo clínico serão manipuladas diminuindo riscos e desconforto da punção venosa.
- c) Para doadores voluntários sadios: Como em qualquer outro diagnóstico clínico-laboratorial você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados à coleta de sangue, por punção venosa.
- d) Estão garantidas todas as informações pertinentes ao projeto, antes, durante e depois do estudo.
- e) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de se recusar a participar do estudo, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.
- f) Se qualquer informação relacionada ao estudo for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade do doador seja mantida.
- g) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, etc...) não são da responsabilidade do doador.
- h) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- i) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do doador

_____/_____/_____
Data Nome do pesquisador

ANEXO II



MINISTÉRIO DA DEFESA
EXERCITO BRASILEIRO
C M S - 5ª RM / DE
HOSPITAL GERAL DE CURITIBA

Of nº 001/CEM- HGeC

Curitiba - PR, 18 de Julho de 2002.
Da: Comissão de Ética Médica do Hospital
Geral de Curitiba (HGeC).
Do: Prof. Dr. Roberto Pontarollo Chefe
do Departamento de Farmácia – Setor de
Ciência da Saúde – UFPR.
Assunto: Projeto de Pesquisa.

1. Trata o presente expediente do projeto de pesquisa intitulado “Estudo *in vitro* da influência de compostos isolados de plantas medicinais nas respostas inflamatórias mediadas por leucócitos”, desenvolvido pela mestrandia Mayra Marinho Presibella, regularmente matriculada no curso de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Saúde da UFPR, sob a orientação do Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos e co-orientação da Profª. Dr.ª Almeirane Maria Weffort Santos.

2. Após análise do projeto em questão, registrado no Banco de Pesquisas da UFPR sob o número 2001009704, esta Comissão de Ética Médica deliberou quanto a lisura e o cumprimento das normas de Ética Médica para pesquisa na área de saúde, concluindo que o projeto supracitado cumpre todas as normas legais.

3. Isto posto, a mestrandia em questão poderá desenvolver e concluir a coleta de amostra de pacientes baixados neste hospital bem como dos usuários do HGeC, (mediante a assinatura do termo de consentimento livre esclarecido) cujo os exames laboratoriais foram previamente designados pela Clínica Médica, sem qualquer procedimento invasivo adicional ao paciente, uma vez que, tais amostras seriam desprezadas.

Juvenal Donizete Ozelin-Maj Med
Secretário da Comissão de Ética Médica do HGeC

JUVENAL D. OZELIN
Maj Med CRM-PR 18638
Idt 085704783-1(EB)

ANEXO III

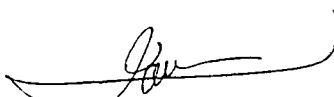
Curitiba, 27 de novembro de 2.002.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Mayra Marinho Presibella
Nesta

Prezada Senhora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“ESTUDO INVITRO DA INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS NAS RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS MEDIADAS POR LEUCÓCITOS”**, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 26 de novembro de 2002, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.
Protocolo CEP-HC Nº 066EXT020/2002-11

Atenciosamente



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR